

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局



協力条約に基づいて公開され、国際出願

(51) 国際特許分類7 <b>C12N 15/12, C07K 14/47, C12N 5/10, G01N 33/53, C12Q 1/68, C07K 16/18 // C12P 21/02, 21/08, A61K 38/16, 48/00, A61P 35/00, 25/28</b>	A1	(11) 国際公開番号 <b>WO00/22123</b>
(21) 国際出願番号 <b>PCT/JP99/05631</b>		(43) 国際公開日 <b>2000年4月20日(20.04.00)</b>
(22) 国際出願日 <b>1999年10月13日(13.10.99)</b>		
(30) 優先権データ 特願平10/290711 <b>1998年10月13日(13.10.98)</b>	JP	東條伸一郎(TOJO, Shinichiro)[JP/JP] 〒659-0091 兵庫県芦屋市東山町7-26-704 Hyogo, (JP) 根本清光(NEMOTO, Kiyomitsu)[JP/JP] 〒420-0911 静岡県静岡市瀬名1-8-3-406 Sizuoka, (JP) 石川弘典(ISHIKAWA, Hironori)[JP/JP] 〒561-0802 大阪府豊中市曾根東町2-10-4-429 Osaka, (JP) 奥山 元(OKUYAMA, Hajime)[JP/JP] 〒662-0831 兵庫県西宮市丸橋町4-15-524 Hyogo, (JP)
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED)[JP/JP] 〒541-8510 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号 Osaka, (JP)		(74) 代理人 青山 蔦, 外(AOYAMA, Tamotsu et al.) 〒540-0001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号 IMPビル 青山特許事務所 Osaka, (JP)
(72) 発明者 ; および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 東藤直樹(TOHDOH, Naoki)[JP/JP] 〒658-0056 兵庫県神戸市東灘区御影町御影字平野1612-9 Hyogo, (JP) 吉間忠彦(YOSHIMA, Tadahiko)[JP/JP] 〒563-0105 大阪府豊能郡豊能町新光風台4-4-8 Osaka, (JP) 小宮和雄(KOMIYA, Kazuo)[JP/JP] 〒662-0831 兵庫県西宮市丸橋町4-15-215 Hyogo, (JP)		(81) 指定国 AU, CA, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書

(54)Title: NOVEL PROTEIN WAR-1 AND GENE THEREOF

(54)発明の名称 新規なタンパク質WAR-1及びその遺伝子

(57) Abstract

A novel protein WAR-1 having an activity of inhibiting the proliferation of cancer cells; a DNA encoding the above WAR-1; an expression vector containing this DNA; a transformed cells having this expression vector transferred thereto; a hybridization probe or a PCR primer DNA comprising the whole DNA encoding WAR-1 or a part thereof; an antibody against the above WAR-1; and utilization of these substances in diagnosis and therapy.

癌細胞に対する増殖阻害活性を有する新規なタンパク質WAR-1、該WAR-1をコードするDNA、該DNAを含有する発現ベクター、該発現ベクターの導入された形質転換細胞、前記WAR-1をコードするDNAの全部又は一部よりなるハイブリダイゼーションプローブ又はPCRプライマー用のDNA、前記WAR-1に対する抗体、あるいはこれらの物質の、診断及び治療における用途。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

A E	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	K Z	カザフスタン	R U	ロシア
A L	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スードーン
A M	アルメニア	ES	スペイン	L I	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
A T	オーストリア	F I	フィンランド	L K	スリ・ランカ	SG	シンガポール
A U	オーストラリア	FR	フランス	L R	リベリア	S I	スロヴェニア
A Z	アゼルバイジャン	GA	ガボン	L S	レソト	SK	スロヴァキア
B A	ボズニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	L T	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
B B	バルバドス	GD	グレナダ	L U	ルクセンブルグ	SN	セネガル
B E	ベルギー	GE	グルジア	L V	ラトヴィア	S Z	スワジランド
B F	ブルガリア・ファン	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
B G	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	T G	トーゴ
B J	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドavia	T J	タジキスタン
B R Y	ブラジル	GW	ギニア・ビサオ	MG	マダガスカル	T Z	タンザニア
B Y	ペラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
C A	カナダ	HR	クロアチア	共和国		TR	トルコ
C C F	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダッド・トバゴ
C C G	コンゴー	ID	インドネシア	MN	モンゴル	U A	ウクライナ
C H	スイス	I E	アイルランド	MR	モーリタニア	U G	ウガンダ
C I	コートジボアール	I L	イスラエル	MW	マラウイ	U S	米国
C M	カメールーン	I N	インド	MX	メキシコ	U Z	ウズベキスタン
C N R	中国	I S	アイスランド	NE	ニジェール	V N	ヴィエトナム
C R C	コスタ・リカ	I T	イタリア	N L	オランダ	Y U	ユーロースラビア
C C J	キューバ	J P	日本	NO	ノールウェー	Z A	南アフリカ共和国
C Y	キプロス	KE	ケニア	N Z	ニュー・ジーランド	Z W	ジンバブエ
C Z	チエシコ	KG	キルギスタン	P L	ポーランド		
D E	ドイツ	K P	北朝鮮	P T	ポルトガル		
D K	デンマーク	K R	韓国	RO	ルーマニア		

## 明細書

## 新規なタンパク質WAR-1及びその遺伝子

## 技術分野

5 本発明は、WAR-1と称される新規なタンパク質およびその遺伝子に関する。さらに詳しくは、癌細胞に対する増殖阻害活性を有する新規なタンパク質WAR-1、該WAR-1をコードする遺伝子、前記WAR-1に対する抗体、あるいはこれらの物質の、診断及び治療における用途などに関する。

10 さらに、本発明は、脳において特異的な発現が認められる小胞体膜タンパク質であるWAR-1ポリペプチドまたはそれをコードする遺伝子を有効成分とする神経栄養因子分泌促進剤に関する。

## 背景技術

15 近年、制癌剤の開発は、細胞の複製・遺伝子の転写や翻訳というセントラルドグマをターゲットにしたもののはじめ、シグナル伝達、分化、細胞周期、代謝、アポトーシス、テロメレース等に着目したものなど、様々な方面からの薬剤の開発が進められている。しかし、未だ決定的な薬剤が見出されたとは言えない状況にあり、新たなメカニズムに基く制癌剤の創生が望まれている。

20 ところで、シグナルペプチドを有するタンパク質のmRNAは、シグナル配列が合成された後に小胞体膜を透過し、その後小胞体内で翻訳の起こることが知られている。この小胞体膜輸送（小胞体膜透過）に関与する因子として、TRAMと称する因子の存在が知られている（Görlich et al., Nature, 357, 47-52, 1992）。

25 通常、小胞体の膜を輸送されるタンパク質のmRNAは、細胞質へ輸送後リボゾームと結合し、翻訳が開始され、膜透過に必要なシグナル配列がシグナル配列認識タンパク質に結合する。その後、複合体はシグナル配列認識タンパク質レセプターに結合し、小胞体膜上に固定される。次いで、シグナル配列認識タンパク質から解離した翻訳タンパク質とリボゾーム複合体は、Sec61pと結合し、その際、小胞体膜上に存在するTRAMがシグナル配列を認識して、複合体に会合する。その後、翻訳されたタンパク質はSec61pを介して小胞体のルーメ

ン側に輸送されると考えられている (Jungnickel et al., Cell, 82, 261-270, 1995)。以上のような小胞体膜輸送のメカニズムには例外もあり、ある種のシグナル配列を有するタンパク質の小胞体膜輸送には、TRAMは必ずしも必要ではないことも知られている (Voigt et al., J. Cell Biol., 134, 25-35, 1996)。

5 このような小胞体膜輸送に関するTRAMに対し、そのアミノ酸配列および塩基配列に相同性（ホモロジー）を有する因子が存在しているとの報告は、急性骨髓性白血病細胞で見出されたKIAA0057遺伝子 (Nomura et al., DNA Res., 1, 223-229, 1994)以外なされていない。また、それらの因子と前記癌との関連などについても、何ら報告はなされていない。

#### 10 発明の開示

本発明は、新規なタンパク質WAR-1およびその遺伝子を提供することを目的とする。すなわち本発明は、構造的にはTRAMと高い相同性を有しており、機能的には癌細胞に対する増殖阻害活性を有する新規なタンパク質であるWAR-1、該WAR-1をコードする遺伝子、前記WAR-1に対する抗体、あるいはこれらの物質の、診断及び治療における用途を提供することを目的とする。

また、本発明の目的は、小胞体膜タンパク質であるWAR-1ポリペプチドまたはその一部、またはそれらをコードする遺伝子を有効成分とする神経栄養因子分泌促進剤を提供することである。

20 本発明者らは、種々の新規なcDNAのクローニングを目的として、幼若ラットcDNAライブラリーからランダムにクローンの選択を行っていた。その過程において、シグナルペプチドを有するタンパク質の小胞体膜輸送（小胞体膜透過）に関するTRAM (Görlich et al., Nature, 357, 47-52, 1992) やKIAA0057 (Nomura et al., DNA Res., 1, 223-229, 1994) と高い相同性を有する新規なタンパク質をコードする遺伝子のクローニングに成功した。本発明者らはこの新規なタンパク質をWAR-1と命名した。該WAR-1は前記のように構造上、TRAMと相同性を有する因子であったが、機能については皆目不明であった。本発明者らはさらに検討を続けた結果、該WAR-1遺伝子を癌細胞内で発現させることにより癌細胞の増殖が阻害されること、すなわち本発明のWAR-1は癌細胞の増殖阻害活性を有するものであることが明らかとなつた。従つ

て本発明のWAR-1、又は該WAR-1をコードする遺伝子を有効成分として含有する医薬は、新規な抗癌剤として利用できるものと考えられる。ちなみに本発明のWAR-1は、悪性度の高い肉腫の癌の増殖をも抑制するものであることから、臨床上の有用性が期待される。

さらに、WAR-1遺伝子の組織及び種々の癌細胞での発現を検討した結果、該WAR-1遺伝子は、肝臓、肺、リンパ系組織（脾臓、胸腺、白血球）などの組織においては通常発現が認められないが、癌化することによって特異的に発現していくことが明らかとなった。従って本発明のWAR-1遺伝子の部分断片、又は該WAR-1に対する抗体などが、これらの癌の診断に利用できるものと考えられる。

また、本発明者らは、分泌タンパク質の小胞体への膜輸送に関わるタンパク質WAR-1の遺伝子が成熟したラット脳で過剰に発現していることに着目し、当該遺伝子のグリア細胞における発現上昇により神経突起伸展作用を有するタンパク質の分泌が増大していることを示す事象を捉えた。さらには、該遺伝子の発現增加により、生体内のグリア細胞または神経細胞自身が実際に産生している複数の神経栄養因子の分泌が促進されることを見出した。

より詳細には、本発明者らは、配列番号：1に記載されたラット型WAR-1（以下、本明細書においてはrWAR-1と略すことがある）遺伝子が脳のみならず網膜でも発現していることを明らかとし、また、配列番号：2に記載されたヒト型WAR-1（以下、本明細書においてはhWAR-1と略すことがある）遺伝子が脳全体に発現していることに加えて脊髄でも発現が認められることから、中枢神経領域のみならず末梢神経領域においても特異的に発現していることを明らかにした。さらに、hWAR-1遺伝子を含む組換えアデノウイルスベクターを感染させたヒトグリア芽細胞腫株であるT98G細胞の培養上清中に、ラット副腎褐色細胞腫由来のPC12細胞に対して神経突起伸長作用を有する神経栄養因子が増加していることを見出した。

本発明は、以上のような知見に基づき完成するに至ったものである。

即ち本発明は、

- (1) 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA、

(a) 配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質  
(b) 配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列のうち1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質

5 (2) 以下の(c)又は(d)のDNA、

(c) 配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNA

(d) 前記(c)のDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするDNA

10 (3) 配列番号：1又は配列番号：3に記載のDNAの全部又は一部をプローブに用いて染色体DNAライブラリーからクローニングされる、前記(2)記載のDNA、

(4) プロモーター領域を含むことを特徴とする、前記(3)記載のDNA、

(5) 受託番号FERM BP-6910、又は受託番号FERM BP-6911で表示される微生物が有する、前記(1)又は(2)記載のDNA、

15 (6) 前記(1)～(5)いずれか記載のDNAを発現することによって得られるタンパク質、

(7) 前記(1)～(5)いずれか記載のDNAを含有する組換え発現ベクター、

20 (8) 前記(1)～(5)いずれか記載のDNAを含有する組換えアデノウイルスベクター、

(9) 前記(7)又は(8)記載の組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換細胞、

25 (10) 前記(1)～(5)いずれか記載のDNAの全部又は一部よりなる1本鎖又は2本鎖DNAであって、かつ配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列よりなるDNAの発現を特異的に検出し得る、ハイブリダイゼーションプローブ又はPCRプライマー用のDNA、

(11) 以下の配列よりなる、前記(10)記載のDNA、

5'側プライマー配列；5'-CACCTGGCTGGATCGCAGAACATCGG-3' (配列番号：7)

3'側プライマー配列；5'-CTCTTCCTCTTGGCGGACAGTC-3' (配列番号：8)

(12) 前記(10)又は(11)記載のDNAを、ハイブリダイゼーションプローブ又はPCRプライマーとして用いることを特徴とする、配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列よりなるDNAの発現の検出方法、

(13) 前記(6)記載のタンパク質に結合する抗体、

5 (14) 前記(13)記載の抗体を用いることを特徴とする、配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列よりなるタンパク質の発現の検出方法、

(15) 前記(12)又は(14)記載の検出方法よりなる、癌の診断方法、

(16) 前記(1)～(5)いずれか記載のDNA、又は前記(6)記載のタンパク質のいずれかを有効成分として含有する医薬、

10 (17) 配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列よりなるDNAの発現を増加させることを特徴とする、癌細胞増殖阻害剤、

(18) 前記(1)～(5)いずれか記載のDNAを有効成分とする、癌細胞増殖阻害剤、

15 (19) アデノウイルスベクターを用いることを特徴とする、前記(18)記載の癌細胞増殖阻害剤、

(20) 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAを有効成分とする神経栄養因子分泌促進剤、

(a) 配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質

20 (b) 配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列のうち1若しくは数個または複数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列となり、かつ神経栄養因子の分泌促進活性を有するタンパク質

(21) 以下の(c)又は(d)のDNAを有効成分とする神経栄養因子分泌促進剤、

(c) 配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNA

25 (d) 前記(c)のDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ神経栄養因子の分泌促進活性を有するタンパク質をコードするDNA

(22) 配列番号：1又は配列番号：3に記載のDNAの全部又は一部をプローブに用いて染色体DNAライブラリーからクローニングされるDNAを有効成分とする、前記(21)記載の神経栄養因子分泌促進剤、

(23) プロモーター領域を含むことを特徴とするDNAを有効成分とする、

前記(22)記載の神経栄養因子分泌促進剤、

(24) 受託番号FERM BP-6910、又は受託番号FERM BP-

6911で表示される微生物が有するDNAを有効成分とする、前記(20)又

5 (21)記載の神経栄養因子分泌促進剤、

(25) DNAが組換え発現ベクターに含まれていることを特徴とする、前記

(20)～(24)いずれか記載の神経栄養因子分泌促進剤、

(26) DNAがアデノウイルスベクターに含まれていることを特徴とする、

前記(25)記載の神経栄養因子分泌促進剤、

10 (27) 以下の(a)又は(b)のタンパク質を有効成分とする神経栄養因子分泌促進剤、

(a) 配列番号:2又は配列番号:4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号:2又は配列番号:4に記載のアミノ酸配列のうち1若しくは数個または複数個のアミノ酸が欠失、置換及び/又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ神経栄養因子の分泌促進活性を有するタンパク質

15 (28) 以下の(c)又は(d)のDNAによってコードされるタンパク質を有効成分とする神経栄養因子分泌促進剤、

(c) 配列番号:1又は配列番号:3に記載の塩基配列からなるDNA

(d) 前記(c)のDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ神経栄養因子の分泌促進活性を有するタンパク質をコードするDNA

20 (29) 受託番号FERM BP-6910、又は受託番号FERM BP-6911で表示される微生物が有するDNAによってコードされるタンパク質を有効成分とする、前記(27)又は(28)記載の神経栄養因子分泌促進剤、

(30) 配列番号:1又は配列番号:3に記載のDNAの発現を増強する物質または配列番号:2又は配列番号:4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質の産生を増強する物質を有効成分とする神経栄養因子分泌促進剤、

(31) 前記(20)～(30)いずれか記載の神経栄養因子分泌促進剤を含有する神経変性疾患治療剤、ならびに

(32) 配列番号:1又は配列番号:3に記載の塩基配列よりなるDNAの發

現を増強すること、または配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質の産生を増強することを特徴とする、神経栄養因子の分泌促進方法、に関する。

本発明の第1の態様は、新規なタンパク質WAR-1と該WAR-1をコードするDNAに関する。

本発明のDNAのうちタンパク質をコードするものとしては、新規なタンパク質WAR-1をコードするDNA、又は該WAR-1をコードするDNAに類似のDNAであって、かつ癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするDNAであれば特に限定されない。具体的には、以下の1)～3)のDNAが例示される。

1) 配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、あるいは配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNA。

2) 配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列のうち1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするDNA。

3) 配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNAとストリージェントな条件下でハイブリダイズし、かつ癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするDNA。

以下、これらのDNAにつき順次説明する。

### 1) WAR-1をコードするDNA

前記DNAのうち、「配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA」、「配列番号：1に記載の塩基配列からなるDNA」とは、本発明のラットWAR-1をコードするDNAである。また「配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA」、「配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNA」とは、本発明のヒトWAR-1をコードするDNAである。このような、本発明のラットおよびヒトWAR-1をコードするDNAは、以下の如く寄託がなされている。

すなわち、配列番号：1に記載のラットWAR-1をコードするDNAをベク

ター pBlue script II に組み込んだ p rWAR-1 を含有する大腸菌 E. coli DH5 $\alpha$  (p rWAR-1) 、及び、配列番号：3 に記載のヒトWAR-1 をコードするDNAをベクター pBlue script II に組み込んだ pHWAR-1 を含有する大腸菌 E. coli DH5 $\alpha$  (p hWAR-1) は、茨城県つくば市東1丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に、それぞれ受託番号 FERM P-17018 および FERM P-17019 で寄託されている（受託日：いずれも平成10年10月6日）。その後、国際寄託へ移管された（受託番号：BP-6910 および BP-6911、国際寄託への変更日：いずれも平成11年10月7日）。

10 2) WAR-1 の改変体又は変異体をコードするDNA

前記DNAのうち、「配列番号：2 又は配列番号：4 に記載のアミノ酸配列のうち 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするDNA」 とは、人為的に作製したいわゆる改変体（改変タンパク質）や、生体内に存在する変異体のうち、癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするDNAを指す。

前記改変体をコードするDNAは、例えば制限酵素やヌクレアーゼ等を用いる方法、部位特異的変異導入方法 (W. Ito et al., Gene, 102, 67-70 (1991)) 、またはPCR法 (Molecular Cloning, 2nd Edt. Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) などによって、当業者ならば容易に作製することができる。

ここで、「欠失、置換及び／又は付加」されるアミノ酸残基の数は、上記部位特異的変異導入法等の周知の方法により欠失、置換及び／又は付加できる程度の数を指す。

25 さらに、前記の如き遺伝子工学的手法を用いずに、細胞を変異原物質に曝すことによっても、当該改変体をコードするDNAを作製することが可能である。

前記変異体をコードするDNAとは、生体内において自然に生じるものとす。すなわち、塩基及びアミノ酸の欠失、置換または付加は、自然界に存在する、例えば癌のような場合や種差によつても生じることがあり、このような自然に生じ

た変異体をコードするDNAも、癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするものである限り、本発明のDNAの範疇に含まれる。

前記改変等を施したDNAが癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするものであるか否かは、例えば以下の方法により測定することができる。

すなわち、前記改変を施したDNA等、本発明のDNAの候補となるDNAを発現ベクターに組み込み、これをヒト由来の癌細胞株に導入する。ここで癌細胞株としては、例えばT98Gなどのヒトグリア芽細胞腫を用いることが好ましい。発現ベクターとしては、非ウイルスベクター、ウイルスベクターのいずれであっても、ヒト由来の癌細胞株において発現可能なベクターであれば特に限定されない（該発現ベクターについては後に詳述する）。該組換え発現ベクターを癌細胞株に導入し、培養した後に、細胞数や細胞の形態変化を観察する。このとき、外来DNAを組み込んでいない発現ベクターを用いて全く同じ操作を行うことにより調製された細胞をコントロールとし、比較することが重要である。コントロール細胞と比較して細胞数の減少、あるいは細胞の形態変化が観察された場合は、前記候補DNAは癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするものであると判断することができる。

さらに、前記の遺伝子導入細胞において<sup>3</sup>Hで標識されたチミジンの取り込み能の低下を測定すること (Nagase et al., Int. J. Cancer, 65, 620-626, 1996)、あるいは癌細胞を接種したヌードマウスに対して前記候補DNAを有するアデノウイルスを感染させた後に、腫瘍形成能の低下を測定すること (Cheney et al., Cancer Res., 58, 2331-2334, 1998)などによつても、癌細胞の増殖阻害活性を有するか否かを測定することができる。

### 3) WAR-1 DNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNA

前記DNAのうち、「配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするDNA」とは、例えば、

- A) 脊椎動物全てのWAR-1をコードするcDNA、又は該WAR-1の部分タンパク質をコードするcDNA、
- B) 脊椎動物全てのWAR-1をコードする染色体DNA、

のような、配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列からなるラット又はヒトWAR-1DNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズするDNAのうち、癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするものを指す。

ここで、「ストリンジエント条件下でハイブリダイズするDNA」とは、例えばハイブリダイゼーション緩衝液として0.1% SDS、50%ホルムアミド、5×SSC、1×Denhardt試薬、 $250\mu g/ml$ サケ精子DNAの組成の溶液を用いて、42°Cで一晩ハイブリダイズした後、2×SSCを用いて室温で1時間洗浄、2×SSC、0.1% SDSを用いて室温で30分間、その後0.1×SSC、0.1%SDSを用いて50～65°Cで30分洗浄するような条件下でハイブリダイズするようなDNAを指す。

前記A)のDNAは、例えば配列番号：1又は配列番号：3に記載のDNAの全部又は一部をプローブに用いたハイブリダイゼーション、あるいは配列番号：1又は配列番号：3に記載のDNAの一部をプライマーに用いたPCR等によりクローニングされるものであるが、具体的なcDNAライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、PCR、ポジティブコロニーの選択、塩基配列の決定等の操作はいずれも公知であり、例えばMolecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等を参照にして行うことができる。以下に、具体的なクローニング方法の一例について記載する。

前記A)のDNAは、例えば以下の工程a)～b)を含む方法により単離することができる。

a) 所望の種由来の組織あるいは培養細胞株より全RNAを調製し、ポリ(A)RNAを精製し、cDNAライブラリーを作製する工程。

b) 配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列の全部又は一部よりなるプローブを調製し、該プローブを用いて前記a)で作製したcDNAライブラリーとのハイブリダイゼーション反応を行うことにより目的のDNAを単離する工程。

ここで、前記a)工程における全RNAの調製は、常法に従って行えば良いが、例えばSDS、NP-40、Triton-X100等の界面活性剤もしくはフェノール存在下で細胞を処理することにより、細胞を分解する方法が挙げられる。また、ホモゲナイザー等の物理的方法によって細胞を破碎し、グアニジンチオシ

アネートで細胞を処理した後、塩化セシウム密度勾配遠心によって全RNAを沈澱化させる、または、グアニジンチオシアネート存在下で細胞を処理した後、酸性条件下フェノール処理（酸性グアニジンチオシアン酸—フェノールクロロホルム法）することによって全RNAを調製する方法も挙げられる。次に上記方法のいずれかによって得られた細胞の全RNAからポリ(A)RNA(mRNA)を精製するには、オリゴ(dT)セルロース、ポリUを結合したポリU—セファロースなどのアフィニティーカラムを用いるか、mRNAの長さが判明している場合もしくは更にmRNAの長さに基づいて分画したい場合には、ショ糖密度勾配遠心法、アガロースゲル電気泳動、カラムによるゲルろ過法等を用いて調製することができる。上記の如くして得られたmRNAよりcDNAライブラリーを作製する方法としては、例えばmRNAを鋳型として一本鎖cDNAを合成し、次いで二本鎖cDNAを合成して適當なベクターに組み込んで宿主大腸菌に組換えベクターを導入する方法が挙げられる。ベクターとしては、プラスミド及びインファージベクターが多用される。以下、該cDNAライブラリーの作製法につき記述する。

まず、mRNAを鋳型とし、オリゴ(dT)プライマーもしくは末端に適當な配列を付加したオリゴ(dT)プライマーまたは6塩基からなるランダムプライマーを用いて、逆転写酵素（トリ骨髓芽球性白血病ウイルス；AMV由来または、マウス白血病ウイルス；Mo-MLV由来）によりmRNAと相補的な一本鎖cDNAを合成する。次いで、アルカリ処理を行うことによってmRNAを分解した後、一本鎖cDNAを鋳型として逆転写酵素もしくはDNAポリメラーゼにより二本鎖cDNAを合成する。ここで二本鎖cDNAの合成は、直接RNase H及び大腸菌DNAポリメラーゼIを働かせることによっても行い得る。その後、いずれの方法においても、S1ヌクレアーゼ、T4-DNAポリメラーゼもしくは大腸菌DNAポリメラーゼI(Klenow断片)等の酵素のいずれかを用いることによって合成された二本鎖cDNAの両末端を平滑化する。得られた平滑末端化された二本鎖cDNAは適當なベクターに挿入する為に、リンカーやアダプター等の化学合成DNAまたはdG, dC鎖をデオキシターミナルトランスフェラーゼによって付加し、末端修飾を行う。次に、適當なベクターにこの二本鎖

c DNAを組み込んだ後、大腸菌を形質転換してc DNAライブラリーを作製する。ここで、プラスミドベクターに二本鎖c DNAを組み込み宿主大腸菌を形質転換する場合は、このDNAを取り込むことの出来るコンピテント細胞の対数増殖期における細胞を集め、Hanahanが詳細に報告している方法

5 (J. Mol. Biol., 166, 557 (1983))に準じて形質転換を行えば良い。また、ファージベクターに二本鎖c DNAを組み込み宿主大腸菌を形質転換させる場合は、T4 DNAリガーゼによって連結されたDNAをインビトロパッケージングによりファージ粒子内に導入し、これを宿主大腸菌に感染させることによって形質転換を行うことができる。

10 次に工程b)であるが、配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列の全部又は一部よりなるプローブを調製し、該プローブと前記で作製したc DNAライブラリーとのハイブリダイゼーション反応を行うことにより目的のDNAを単離することができる。ここでプローブは、例えば配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列の適当な部分断片をDNA合成機により合成するか、あるいは15 PCRにより該部分断片を增幅し、その後ニックトランスレーション法又はランダムプライムラベリング法等の常法により該DNA断片を<sup>32</sup>Pで標識することにより作製することができる。ハイブリダイゼーション反応としては、前述の条件が挙げられる。

前記B)のDNA、すなわちWAR-1をコードする染色体DNAは、例えば20 配列番号：1又は配列番号：3に記載のDNAの全部又は一部、あるいは前記A)に記載のDNAの全部又は一部などをプローブに用い、所望の種由来の組織、あるいは培養細胞株から調製された染色体DNAライブラリーとのハイブリダイゼーションを行うことにより、クローニングすることができる。

ここで、染色体DNAの調製及び染色体DNAライブラリーの作製は、常法に従って行えば良い。すなわち、所望の種由来の組織もしくは培養細胞株をSDS存在下で処理し、RNase及びプロテイナーゼKで不必要的RNA及びタンパク質を分解する。その後、フェノール処理を行い、エタノール沈殿もしくは透析によって染色体DNAを精製すれば良い。得られた染色体DNAを適当な制限酵素を用いて部分的に切断するか、クローニングする断片の長さが判明している場

合には、必要な制限酵素によって完全分解させる。クローニング用のベクターに外来遺伝子を導入する際に許容されるDNAの長さに応じて染色体DNA切断断片を分画するためには、ショ糖密度勾配遠心、アガロースゲル電気泳動、カラムによるゲルろ過法等を用いることができる。得られた切断断片をλファージベクターもしくはコスミドベクターに導入し、インビトロパッケージング後、ファージもしくはコスミドを用いた染色体DNAライブラリーを作製する。

WAR-1をコードする染色体DNAのクローニングを行うためには、前記のファージもしくはコスミドライブラリーを大腸菌に感染させ、WAR-1のcDNAの全部又は一部をニックトランスレーション法もしくはランダムプライムラベリング法などで<sup>32</sup>Pで標識したプローブを用い、常法 (Molecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 等を参照) に従いブラークもしくはコロニー・ハイブリダイゼーションなどを行えば良い。

なお、以上のような染色体DNAには、遺伝子の発現調節に関与する、いわゆるプロモーター領域が含まれており、該プロモーター領域を含有する染色体DNAは、上記の手法により容易に取得することができる。

上記した本発明の種々のDNAを発現ベクターに組み込むことにより、本発明のDNAを含有する組換え発現ベクターを作製することができる。さらに、該組換え発現ベクターを宿主細胞に導入することにより、本発明の形質転換細胞を作製することができる。

該発現ベクターは、非ウイルスベクター、ウイルスベクターのいずれかを問わず、本発明のDNAが挿入でき、該DNAがコードするタンパク質の発現が可能なベクターであれば特に限定されない。ここで非ウイルスベクターとは、一般的な哺乳動物細胞発現プラスミドベクターであり、例えばpBK-CMV、pCA GGS、pCDNA3.1、pZeosVなどが挙げられる。本発明のDNAを組み込んだ非ウイルス性発現ベクターの宿主細胞への導入法としては、リン酸カルシウム共沈法、リポソームを用いてDNA分子を導入する方法 (リポソーム法、リポフェクチン法、リポフェクトアミン法) 、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガンで担体とともにDNA分子を細胞に移入する方法等が挙げられる。また宿主細胞としては、例えばHeLa、C

O S 1、A 5 4 9、2 9 3 細胞などが挙げられる。

後者のウイルスベクターとしては、アデノウイルス及びレトロウイルス等のウイルスベクターが代表的なものである。より具体的には、例えば、無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、センダイウイルス、S V 4 0、免疫不全症ウイルス（H I V）等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに当該タンパク質をコードする遺伝子を導入し、細胞に組換えウイルスを感染させることによって、細胞内に遺伝子を導入することが可能である。その際の宿主細胞としては、例えば2 9 3、A 5 4 9、He La 細胞などが挙げられる。

以上のような本発明の形質転換細胞を好適な条件下で培養し続けることにより、本発明のDNAからタンパク質を発現、生産することが可能である。ここで「好適な条件下」とは、その宿主細胞に適した培養用培地により、37°C、5%CO<sub>2</sub>存在下で培養するような条件を指す。

このような好適な条件下で培養した形質転換細胞より、前記本発明のタンパク質を単離し、精製することができる。ここで、本発明のタンパク質の粗抽出液を得る方法、また、該粗抽出液から本発明のタンパク質を精製する方法としては、例えば日本生化学会編、新生化学実験講座1、タンパク質I一分離・精製・性質一、1990に記載された方法を用いて行うことが可能である。

以上のようにして得られた本発明のタンパク質の具体例としては、例えば配列番号：2に記載のアミノ酸配列よりなるラットW A R-1、又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列よりなるヒトW A R-1が挙げられる。

前記本発明のタンパク質の癌細胞増殖阻害活性は、以下のようにして測定することができる。すなわち、T 9 8 Gなどの癌細胞の培養液中に本発明のタンパク質を添加する。その際、本発明のタンパク質を、あらかじめリポソームに封入したり、リピッドを結合させることにより、細胞膜への透過性を増しておく。また、タンパクのC末端に小胞体保持配列であるL y s - A s p - G l u - L e u (K D E L) を付加したりすることにより、細胞質に取り込まれたタンパク質を小胞体に輸送できるようにする。このような処理を施した本発明のタンパク質を培養

液に添加後、数日間培養し、癌細胞の細胞数や細胞の形態変換を観察することにより、本発明のタンパク質の癌細胞増殖阻害活性を測定することができる。また、<sup>3</sup>Hで標識されたチミジンの取り込み能の低下を測定すること（Nagase et al., Int. J. Cancer, 65, 620-626, 1996）によっても、癌細胞の増殖阻害活性を測定することができる。

5

本発明のタンパク質をコードするDNAの全部又は一部よりなる1本鎖又は2本鎖DNAを、ハイブリダイゼーションプローブ又はPCRプライマーに用いて、生体組織、又は培養細胞株などにおけるWAR-1 DNAの発現を特異的に検出することが可能である。該1本鎖又は2本鎖DNAとしては、WAR-1 DNAの転写産物であるWAR-1のmRNAを選択的に検出することのできる1本鎖又は2本鎖DNAであれば、特に限定されない。

10

具体的な検出方法としては、以下の1）、2）の2つの手法が挙げられる。

15

1) WAR-1のmRNAを特異的に検出することのできる2本の1本鎖DNA（正鎖及び逆鎖）をPCRプライマーとして用い、被験用の組織又は培養細胞株より得られた全RNAもしくはポリ(A) RNAを基質として、PCRにより解析を行う手法。

20

2) WAR-1のmRNAを特異的に検出することのできる1本鎖又は2本鎖DNAを放射標識し、これをプローブとして、被験用の組織又は培養細胞株より得られた全RNAもしくはポリ(A) RNAに対してノーザンプロット解析を行う手法。

以上の1) 及び2) の検出法は、例えばMolecular Cloning 2nd Edt., Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)等の基本書に基づき行うことができる。以下に具体例を示す。

25

1) のPCRの具体的な手法としては、例えば以下の方法が挙げられる。まず、WAR-1のmRNAを特異的に検出することのできるPCRプライマーを常法により合成する。次に、被験用の組織又は培養細胞株より、前述の方法にて全RNA又はポリ(A) RNAを調製し、これを鑄型として、MMTV-RT等の逆転写酵素により1本鎖DNAを調製する。その後、先のPCRプライマーを添加し、常法によりPCR反応を行う。PCR反応の条件としては、例えば95°C 1

分、60°C 1分、72°C 2分を35サイクル行った後に、72°Cで10分加熱するような条件が挙げられる。このPCR反応物を適当な濃度のアガロースゲルにて電気泳動することにより、WAR-1 mRNAの発現の有無を検出することができる。その他、*in situ* PCR法 (Fernandez et al., Mol. Carcinog, 20, 317-326, 1997) を用いることによっても、WAR-1 mRNAの検出を行うことが可能である。

2) のノーザンプロット解析の具体的な手法としては、例えば以下の方法が挙げられる。まず、WAR-1のmRNAを特異的に検出することのできる1本鎖又は2本鎖DNAを放射標識し、プローブを作製する。2本鎖DNAの場合は、  
10 例え前記1) の手法により調製されたPCR反応物を、ニックトランスレーション法又はランダムプライムラベリング法などで<sup>32</sup>P標識することにより作製される。次に、被験用の組織又は培養細胞株より、前記と同様の手法により全RNA又はポリ(A)RNAを調製し、常法によりホルムアルデヒドゲル電気泳動及びナイロンメンブレンへのプロッティングを行う。このメンブレンと、先のプローブとのハイブリダイゼーションを行うことにより、WAR-1 mRNAの発現の有無を検出することができる。ハイブリダイゼーションの条件としては、2本鎖DNAをプローブとして用いる場合、例えば4.5% (v/v) ホルムアミド、5  
15 ×SSPE、2×デンハルト溶液、0.5% SDS、20 μg/ml サケ精子DNAの条件で42°C、16-24時間ハイブリダイズさせた後に、2×SSPE、0.5% SDS中で室温、10分間2-3回洗浄し、更に65°C、2×SSPE、0.5% SDS中で20分間2-3回洗浄するような条件が挙げられる。

前記検出方法において使用される1本鎖又は2本鎖DNAとしては、具体的には以下のものが挙げられる。

25 すなわち図1に、ヒトWAR-1 (hWAR-1) 及びラットWAR-1 (rWAR-1) の塩基配列を、小胞体膜輸送に関する公知の因子であるヒトTRAM (hTRAM) およびヒトKIAA0057の塩基配列と比較した結果を示しているが (図中、黒枠が相同性を有する部分) 、ヒトWAR-1に特異的なプローブ又はプライマー部分の選択に関しては、ヒトTRAMとヒトWAR-1の

相同性が低い領域を選択することが重要である。この際、両者のcDNAから増幅されるDNA断片を区別できるようにするため、一方の配列に一部塩基配列の欠失のある領域を増幅することが好ましい。また、両者のcDNAを特異的に認識するプライマーとして、プライマー配列全領域で相同性がないことが好ましいが、特に3'末端近傍の配列が大きく異なる方が、増幅したくないcDNAに対して伸長反応が進みにくくなるため、特異性が向上すると考えられる。さらに、3'末端の塩基が異なるように設定すればより特異的な増幅に効果的である。また、National Biosciences社のソフトウェアOligo等のプログラムによるプライマー解析も利用し得る。

以上のようにして選択した部分を基にして、常法により前記1)のプローブ又は前記2)のプライマーを作製することができる。

一例としては、以下の配列よりなる1本鎖DNA、又はこの1本鎖DNAをプライマーとして前記PCR反応を行うことにより増幅される2本鎖DNAなどが挙げられる。

5'側プライマー配列；5'-CACCTGGCTGGATCGCAGAACGG-3'（配列番号：7）

3'側プライマー配列；5'-CTCTTCCTCTTGGCGGACAGTC-3'（配列番号：8）

ここで配列番号：7は、図1のhWAR-1DNAの第823位～第846位の正鎖部分に相当し、配列番号：8は、図1のhWAR-1DNAの第1093位～第1116位の逆鎖部分に相当する。

以上のような1本鎖DNA又は2本鎖DNAを前記検出方法1)のPCRプライマー、又は前記検出方法2)のハイブリダイゼーションプローブとして用いることにより、WAR-1のDNAの特異的な発現を検出することができる。詳しくは実施例4を参照されたい。なお、このようなプライマーおよびプローブは、天然のWAR-1由来の配列のみに限定されず、WAR-1DNAの転写産物であるWAR-1のmRNAを特異的に検出することのできるDNAであれば、置換、欠失、付加などの修飾を施したものであっても良い。

以上のようなWAR-1DNAの発現検出方法の具体的な用途としては、疾患の診断目的の他、in situハイブリダイゼーションのような研究目的にも応用される。

「課題を解決する手段」において記述したように、WAR-1遺伝子は、肝臓、肺、リンパ系組織（脾臓、胸腺、白血球）などの組織においては通常発現が認められないが、これらの組織が癌化することによって、特異的に発現してくることが明らかとなった。従って、前記のようなWAR-1特異的なPCRプライマー又はハイブリダイゼーションプローブを用い、患者由来の癌組織又は癌細胞に対して前記の如きWAR-1mRNAの検出を行うことにより、癌の診断を行うことができる。

本発明において抗体とは、前記した本発明のタンパク質に結合する抗体である。該抗体は、例えば、Antibodies; A Laboratory Manual, Lane, H. D. ら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1989)、新細胞工学実験プロトコール、秀潤社(1993)などに記載の方法により容易に作製される。すなわち、本発明のタンパク質又はその一部を用いて常法により適宜動物を免疫することにより、本発明のタンパク質に結合する抗体を作製することができる。

ここで、免疫抗原として使用される本発明のタンパク質は、前記したように、本発明のDNAを含む組換え発現ベクターを大腸菌もしくは培養細胞株に導入し、これらの形質転換体より当該ポリペプチドを大量に調製、精製することにより、得ることができる。また、本発明のタンパク質のアミノ酸配列の一部よりなるペプチドを常法により合成し、BSAやKLH等にコンジュゲーションを行い、これを免疫抗原とすることも可能である。

免疫感作する種としては、ウサギ、マウス、ラット、ニワトリ、ウシ、ロバ、ヒツジ、ウマ等何れでも良く、また、当該本発明のタンパク質を認識する抗体であれば、ポリクローナル抗体もしくはモノクローナル抗体の何れでも良い。

該抗体は、WAR-1タンパク質の発現の検出、又は該タンパク質の分離などに使用される。具体的には、アフィニティーコロマトグラフィー、cDNAライブラリーのスクリーニング、免疫学的診断などに利用することができる。

本発明の抗体を用いることにより、癌の免疫学的診断を行うことができる。すなわち、本発明の抗体を用いることにより、WAR-1を産生する癌組織または細胞を検出することが可能となり、癌の診断に適用することが可能となる。具体的な検出法としては、蛍光抗体法、ウェスタン・ブロット法、免疫沈降法、免疫

組織染色法が挙げられる。このうち、蛍光抗体法についての具体的な手順は、Samoszuk et al., Am. J. Clin. Pathol., 109, 205-210, 1998やBernardini et al., Tumori., 83, 673-678, 1997に記載された方法に準じて行えばよい。

本発明のDNA又は本発明のタンパク質は、医薬の有効成分とすることができる。  
5 前記したように本発明のタンパク質は、癌細胞に対する増殖阻害活性を有している。従って本発明のDNAを医薬の有効成分として癌患者に投与し、体内で発現させる遺伝子治療剤として使用するか、又は本発明のタンパク質を医薬の有効成分として癌患者に投与することにより、癌細胞の増殖を阻害し、癌の治療を行なうことができる。なお、本発明のDNA又はタンパク質を有効成分として用いる場合のみならず、生体内のWAR-1遺伝子又はタンパク質の発現を誘導するような因子又は化合物を用いた場合にも同様に、前記癌細胞の増殖阻害効果が認められる。従って、このようなWAR-1遺伝子の発現を誘導するような因子、化合物、又はWAR-1タンパク質の発現を誘導するような因子、化合物を有効成分とする癌細胞増殖阻害剤もまた、本発明の範疇に含まれる。

15 本発明のタンパク質を有効成分とする治療剤は、アジュバントとともに投与したり、粒子状の剤形にして投与することができる。剤形として、より具体的には、リポソーム製剤、直径数 $\mu\text{m}$ のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤等の剤形にすることができる。投与方法としては徐放性のミニペレット製剤などが挙げられる。本発明のタンパク質の様に、小胞体に存在すると予想されるタンパク質を本タンパク質が機能する小胞体に選択的に輸送するためには、小胞体に保持されることが知られるタンパク質のC末端に存在するLys-  
20 Asp-Glu-Leu (KDEL)配列を本タンパク質のC末端に付加することが可能である。C末端にKDEL配列を有するタンパク質は、ゴルジ体及び小胞体に存在するレセプタータンパク質に結合し、ゴルジ体から小胞体に逆輸送することが知られている (Majoul et al., J. Cell Biol., 133, 777-789, 1996)。更に、特定の糖ペプチド鎖や糖鎖をタンパク質に付加することやビオチンを結合させることによって本タンパク質に組織移行選択性をもたらすことが可能である。具体的には、肝細胞に特異的にタンパク質を蓄積させるために、asialoglycoprotein (Merwin et al., Bioconjug Chem., 5, 612-620, 1994) や

g a l a c t o s e (Chen et al., Hum Gene Ther., 5, 429-435, 1994) でポリペプチドを修飾することが可能である。また、特定の組織や細胞で発現するタンパク質と結合するタンパク質をビオチン化し、アビジンとビオチン化した本タンパク質とで複合体を形成させることによって組織移行性を高めることが可能である  
5 (Saito et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 10227-10231, 1995,  
Pardridge et al., Pharm. Res., 11, 738-746, 1994)。

投与量は、癌細胞の特性、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常 $0.001\text{mg}/\text{Kg}/\text{回} \sim 1000\text{mg}/\text{Kg}/\text{回}$ であり、これを初期時には連日投与、その後、数日ないし数ヶ月に1回投与するのが好ましい。  
10 投与形態としては、剤形に応じて経口、動脈注射、静脈注射、筋肉注射、癌組織に対する局所注射により投与することが可能である。

本発明のDNAを有効成分とする遺伝子治療剤は、細胞内でWAR-1タンパク質を大量に産生させ、癌細胞内においては癌細胞の増殖を阻害することができる。

15 本発明のDNAを有効成分とする遺伝子治療剤を癌細胞に導入する場合、その投与形態としては非ウイルスベクターを用いた場合と、ウイルスベクターを用いた場合の二つに大別される。

より詳細に説明すると、本発明のDNAを細胞内で作用させる手段として、以下の方法が挙げられる。

20 A. 非ウイルスベクターを用いる場合

遺伝子発現ベクターに本発明のDNAを導入し、リン酸ーカルシウム共沈法、リポソームを用いてDNA分子を導入する方法（リポソーム法、リポフェクチン法、リポフェクトアミン法）、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、パーティクルガンで担体とともにDNA分子を細胞に移入する方法等の何れかの方法により組換え発現ベクターを細胞内に取り込ませることが可能である。ここで用いられる発現ベクターとしては、例えばpBK-CMV、pCA GGS、pCDNA3.1、pZeoSV等が挙げられる。

25 B. ウイルスベクターを用いる場合

ウイルスベクターとしては、組換えアデノウイルス、レトロウイルス等のウイ

ルスベクターを用いた方法が代表的なものである。より具体的には、例えば、無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス、センダイウイルス、SV40、免疫不全症ウイルス（HIV）等のDNAウイルスまたはRNAウイルスに本発明のDNAを導入し、細胞に組換えウイルスを感染させることによって、細胞内に遺伝子を導入することが可能である。

前記ウイルスベクターの内、アデノウイルスの感染効率が他のウイルスベクターを用いた場合よりもはるかに高いことが知られており、従って、アデノウイルスベクター系を用いることが好ましい。

これらの方法の何れかを用いることによって、WAR-1をコードする遺伝子を癌細胞内に導入することが可能である。また、非ウイルスベクターによる遺伝子治療では、局所投与や組織移行性を高めた剤形との組み合わせ等によって疾患部位の近傍に遺伝子を導くことが好ましいが、ウイルスベクターによる遺伝子治療では、必ずしも局所投与をする必要はなく、静脈内投与も可能である。投与形態としては、製剤形態（例えば液剤など）をとり得るが、必要に応じて慣用の担体等を加えても良い。また、疾患部位の近傍に遺伝子を導入し易くするために、徐放性の製剤とすることも可能である。

本発明の遺伝子治療剤を実際に医薬として作用させるには、DNAを直接体内に導入するin vivo法、及びヒトからある種の細胞を取り出して体外でDNAを該細胞に導入し、その細胞を体内に戻すex vivo法がある（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36（1）、23-48（1994）、実験医学増刊、12（15）、（1994））。本発明では、in vivo法が好ましい。

製剤中のDNAの含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調節することができるが、通常、本発明のDNAとして0.0001-100mg、好ましくは0.001-10mgであり、これを数日ないし数ヶ月に1回投与するのが好ましい。

本発明の第2の態様は、タンパク質WAR-1または該WAR-1をコードするDNAを有効成分とする神経栄養因子分泌促進剤に関する。

「神経栄養因子分泌促進剤」とは、インビボあるいはインビトロで神経細胞に接触させた場合、その細胞からの神経栄養因子の分泌を促進する作用を示す薬剤を意味する。神経栄養因子とは、1950年に発見された神経成長因子(NGF)のように、神経細胞の生存維持、神経分化促進などの生理作用を有するタンパク質の総称である。

本発明におけるDNAのうちタンパク質をコードするものとしては、タンパク質WAR-1をコードするDNA、又は該WAR-1をコードするDNAに類似のDNAであって、かつ神経栄養因子の分泌促進活性を有するタンパク質をコードするDNAであれば特に限定されない。具体的には、以下の1)～3)のDNAが例示される。

- 1) 配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNA、あるいは配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNA。
- 2) 配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列のうち1若しくは数個または複数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ神経栄養因子の分泌促進活性を有するタンパク質をコードするDNA。
- 3) 配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNAとストリンジメントな条件下でハイブリダイズし、かつ神経栄養因子の分泌促進活性を有するタンパク質をコードするDNA。

これらのDNAの詳細については、前述したとおりである。ただし、DNAがコードするタンパク質の生物活性が、癌細胞の増殖阻害活性ではなく、神経栄養因子の分泌促進活性である点で異なる。

前記DNAが神経栄養因子の分泌促進活性を有するタンパク質をコードするものであるか否かは、当該DNAを導入した細胞の発現する神経栄養因子を解析しても良く、また、細胞外に放出された神経栄養因子を解析しても良い。例えば、以下の方法により測定することができる。

生化学的な解析方法としては、各種の神経栄養因子を認識する抗体を用いたウェスタンプロット法、ELISAやRIA等を用いるのが簡便である。さらに、抗体を用いた免疫組織染色に電子顕微鏡技術を応用し、小胞体に神経栄養因子が蓄積して

いることを確認する方法が挙げられる。この方法は、細胞質中で新たに翻訳されるタンパク質がシグナル認識タンパク質やWAR-1に出会わない場合には細胞質中に大量に存在するタンパク質分解酵素により分解を受ける一方、一旦シグナル認識タンパク質やWAR-1に結合して粗面小胞体が形成された後は、タンパク質分解酵素の少ない小胞体にタンパク質は安定に存在するという前提に基づくものである。

また、生物学的な解析方法としては、遺伝子導入された形質転換細胞の培養上清中に神経突起伸長作用を持つ神経栄養因子が蓄積しているかをみることが挙げられる。具体的には、各種の神経栄養因子の添加により神経突起伸長作用が認められるラット副腎褐色細胞腫由来のPC12細胞に対し、形質転換細胞の培養上清を作用させることにより、神経突起伸長作用を持つ神経栄養因子が形質転換細胞の培養上清中にコントロールより多く蓄積しているかを調べる。PC12細胞は、大日本製薬や理研ジーンバンクから容易に入手することができる。第一の選択としては、生物学的な解析方法の方が好ましい。

神経突起伸長作用が認められた場合、どの様な神経栄養因子が増えているかを検討するための次の手段として、生化学的な解析を行うことが必要となる。この場合、多数の抗体を用いて様々な神経栄養因子を検出する必要があるが、未知の因子が含まれる可能性も否定できない。

未知因子の存在の有無を確認する為には、神経栄養因子群やそれらレセプターに結合してそれらの活性を消失させるような様々な、いわゆる中和抗体で培養上清を処理して、神経突起伸長作用の低下を見れば良い。中和抗体の存在下でも顕著な突起伸長作用が残存する場合は、未知の神経栄養因子が含まれている可能性がある。

さらに、WAR-1遺伝子の発現を増強することにより、神経栄養因子の分泌が促進されたことを確認するための方法として、例えば特定の神経栄養因子遺伝子を導入した細胞や特定の神経栄養因子の放出が知られている細胞を用いることができる。より簡便には、後者の細胞、特に癌由来の細胞株の利用が好ましい。

特定の神経栄養因子を放出するものとして、例えばヒトアストロサイト由来のグリオ芽細胞腫であるT98G細胞を用いることができる。T98Gは大日本製

薬社から容易に入手することができる。T98G細胞が放出する神経栄養因子として、NGF (Emmett et al., Neurochem. Int., 30, 465-474, 1997) 、TG F- $\beta$ 1、 $\beta$ 2 (Naganuma et al., Neurol Med Chir (Tokyo), 36, 789-795, 1996) 、PDGF-B (Potopova et al., Int. J. Cancer, 66, 669-677, 1996) 、5 bFGF (Takahashi et al., FEBS Lett., 288, 65-71, 1991) 、IGF-1 (Ambrose et al., J. Cell Physiol., 159, 92-100, 1994) 等の複数の因子が知られている。上記の複数の神経栄養因子を放出していることが判明しているT98G細胞に対してWAR-1遺伝子を導入し発現させ、得られた形質転換細胞の培養上清を用いて、PC12細胞の神経突起伸長作用を指標とした生物学的な解析を行うことにより、WAR-1タンパク質の産生増加によって神経栄養因子の分泌が促進したことが示された。

前述した方法により、本発明のDNAで形質転換された細胞を好適な条件下で培養し続けることにより、本発明におけるDNAからタンパク質を発現、生産することが可能である。ここで「好適な条件下」とは、その宿主細胞に適した培養用培地により、37°C、5%CO<sub>2</sub>存在下で培養するような条件を指す。

このような好適な条件下で培養した形質転換細胞より、前記本発明のタンパク質を単離し、精製することが可能である。ここで、本発明のタンパク質の粗抽出液を得る方法、また、該粗抽出液から本発明のタンパク質を精製する方法としては、例えば日本生化学会編、新生化学実験講座1、タンパク質I一分離・精製・性質一、1990に記載された方法を用いて行うことが可能である。

以上のようにして得られた本発明におけるタンパク質の具体例としては、例えば配列番号：2に記載のアミノ酸配列よりなるラットWAR-1、又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列よりなるヒトWAR-1が挙げられる。

前記本発明におけるタンパク質による、神経栄養因子の分泌促進の活性は、以下のようにして測定することができる。

ヒトグリア芽細胞腫株T98Gなどの細胞の培養液中に該タンパク質を添加する。その際、該タンパク質を、あらかじめリポソームに封入したり、リピッドを結合させることにより、細胞膜への透過性を増しておく。また、タンパクのC末端に小胞体保持配列であるLys-Asp-Glu-Leu (KDEL) を付加

したりすることにより、細胞質に取り込まれたタンパク質を小胞体に輸送できるようとする。このような処理を施した該タンパク質を培養液に添加後、数日間培養し、培養上清を得る。得られた培養上清を用いて、DNAによる神経栄養因子の分泌促進の活性を測定した前述の方法と同様にして、神経栄養因子の分泌促進活性を測定する。

本発明の神経栄養因子分泌促進剤には、有効成分として、WAR-1遺伝子の発現を増強またはWAR-1タンパク質の産生を増強する物質を含んでも良い。当該物質の神経栄養因子の分泌促進活性の測定には以下の方法が挙げられる。

WAR-1遺伝子の発現を増強またはWAR-1タンパク質の産生を増強する物質の選別は、WAR-1タンパク質に対する抗体を用いて細胞内のWAR-1タンパク質の蓄積を直接調べることで実施できる。その際は、WAR-1タンパク質に標識となるTaq配列を付加し、抗Taq抗体を用いることもできる。

また、WAR-1が関与する特定の分泌タンパク質因子または細胞膜タンパク質因子の小胞体中の蓄積を調べることで行うことができる。特定の分泌タンパク質因子の分泌を指標とする場合は、細胞の培養上清におけるそれらタンパク質の蓄積をELISA等を用いて調べることができる。また、特定の膜タンパク質因子の細胞膜における蓄積を指標とする場合は、それら因子の抗体を用いたウェスタンプロットやFACS解析またはそれらの因子が特定のリガンドのレセプターである場合は、リガンドとの結合能の増加を基に調べることができる。

細胞に対する作用をもって評価することも可能である。例えば、本明細書に記載されたように該物質を作用させた特定の細胞から放出され培養上清に蓄積した因子による生物学的作用、例えば、神経突起伸長作用をもって評価することも可能である。

また、遺伝子の発現が増強されているかを検討するためには、WAR-1遺伝子の発現上昇をノーザンプロット解析やRT-PCRによって直接調べることができる。また、WAR-1遺伝子のプロモーター領域を含む5'上流配列を用いて、これをlacZ、ルシフェラーゼ遺伝子またはGFP等のレポーター遺伝子に連結した発現ベクターを特定の細胞に導入し、レポーター遺伝子の活性を指標に該物質の作用を調べることもできる。

本発明におけるDNA又はタンパク質は、神経栄養因子の分泌促進活性を有するので、神経変性疾患治療剤の有効成分とすることができます。神経変性疾患とは、酸化的ストレス、神経毒、遺伝的素因等による複合的な作用により、神経の変性・脱落を伴う疾患であり、具体的には、アルツハイマー病、脳梗塞性痴呆症、  
5 パーキンソン病、ハンチントン病、およびALS等が挙げられる。

本発明の神経変性疾患治療剤は、(1) WAR-1タンパク質そのものまたは  
はその一部を有効成分とする治療剤として使用しても良く、(2) WAR-1を  
コードするDNAを有効成分として患者に投与し、体内で発現させる遺伝子治療  
剤として使用しても良く、また(3) WAR-1遺伝子の発現又はWAR-1ポ  
10 リペプチドの産生を増強する物質を有効成分としても良い。

神経細胞の生存維持に関わる神経栄養因子の作用は、グリア細胞から放出され  
パラクリン的に神経細胞に働く場合と神経細胞から放出されオートクリン的に働く  
場合があるが、本発明による神経変性疾患治療剤の標的細胞は、グリア細胞と  
神経細胞のどちらであっても良い。

15 (1) WAR-1タンパク質そのものまたはその一部を有効成分とする神経変性  
疾患治療剤

WAR-1そのものまたはその一部を有効成分とする治療剤は、神経変性疾患  
前述したWAR-1タンパク質を有効成分とする癌細胞増殖阻害剤と同様に投与  
される。

20 (2) WAR-1をコードするDNAを有効成分とする神経変性疾患治療剤

遺伝子治療剤として用いる場合、神経変性組織内のグリア細胞や神経細胞内で  
WAR-1ポリペプチドを大量に産生させ、神経栄養因子の放出を促進するこ  
ができる。

WAR-1をコードするDNAを有効成分とする遺伝子治療剤を投与する場合、  
25 その投与形態としては非ウイルスベクターによる態様及びウイルスベクターを用  
いる態様の二つに大別される。詳細は前述した、癌細胞増殖阻害剤として用いる  
場合と同様である。

ウイルスベクターのうち、アデノウイルスの感染効率が他のウイルスベクター  
を用いた場合よりもはるかに高く、神経細胞等の非分裂細胞においても外来遺伝

子を発現することが知られており、従って、アデノウイルスベクター系を用いることが神経変性疾患治療剤として最も好ましい。

また、神経細胞への感染が認められるセンダイウイルスベクター系や神経細胞を標的化した場合はヘルペスウイルスベクター系もアデノウイルスベクター系に次いで好ましい。

5 製剤中のDNAの含量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調節することができるが、通常、本発明のDNAとして0.0001-100mg、好ましくは0.001-10mgであり、これを数日ないし数ヶ月に1回投与するのが好ましい。

10 (3) WAR-1遺伝子の発現又はWAR-1ポリペプチドの産生を増強する物質を有効成分とする神経変性疾患治療剤

本発明のDNA又はタンパク質を有効成分とする神経変性疾患治療剤のみならず、生体内のWAR-1遺伝子の発現又はタンパク質の産生を誘導するような因子又は化合物を有効成分として用いた場合にも同様に、神経栄養因子の分泌促進活性が認められる。従って、このようなWAR-1遺伝子の発現を促進するような物質、又はWAR-1タンパク質の産生を促進するような物質を有効成分とする神経変性疾患治療剤も本発明の範疇に含まれる。該物質としては、例えば、ペプチド、ペプチドのアナログ、微生物培養液、合成化合物等が挙げられる。

#### 図面の簡単な説明

20 図1は、ヒト由来TRAM(図中: HTRAM)、ヒト由来KIAA0057(図中: KIAA0057)、ヒト由来WAR-1(図中: HWAR1)及びラット由来WAR-1(図中: RWAR1)をコードするcDNAの塩基配列の相同性の解析結果を示す図である。

25 図2は、ヒト由来TRAM(図中: HTRAM)、ヒト由来KIAA0057(図中: KIAA0057)、ヒト由来WAR-1(図中: HWAR1)及びラット由来WAR-1(図中: RWAR1)をコードするcDNAの塩基配列から推定されるアミノ酸配列の相同性の解析結果を示す図である。

図3は、ヒト由來の各種癌細胞株におけるhWAR-1遺伝子の発現をRT-PCR法によって解析した結果を示す電気泳動写真である。上のレーンはhWA

R-1のRT-PCRの結果を、下のレーンはhTRAMのRT-PCRの結果を、それぞれ示す。

図4は、ヒト各種組織におけるhWAR-1遺伝子の発現をノーザンハイブリダイゼーションによって解析した結果を示す電気泳動写真である。各写真の右に記載した数字は、RNA分子量マーカーのサイズ(Kb)を示している。

図5は、ヒト各種組織におけるhTRAM遺伝子の発現をノーザンハイブリダイゼーションによって解析した結果を示す電気泳動写真である。各写真の右に記載した数字は、RNA分子量マーカーのサイズ(Kb)を示している。

図6は、ヒトグリア芽細胞腫T98Gに、hWAR-1遺伝子を挿入したアデノウイルスを感染させ、形態変化を観察した結果を示す顕微鏡写真である。A：アデノウイルス非感染細胞、B：アデノウイルスベクターのみのアデノウイルス感染細胞、C：hWAR-1のセンス鎖を発現する組換えアデノウイルス感染細胞、D：hWAR-1のアンチセンス鎖を発現する組換えアデノウイルス感染細胞。

図7は、アデノウイルスベクターAxCawtを感染させたT98G細胞の経時的な形態変化を示す顕微鏡写真である。A：感染直後、B：感染8時間後、C：感染21時間後(約1日後)、D：感染31時間後(約1.5日後)、E：感染46時間後(約2日後)、F：感染70時間後(約3日後)。

図8は、hWAR-1のセンス鎖を発現する組換えアデノウイルスAxCAWAR1-Lを感染させたT98G細胞の経時的な形態変化を示す顕微鏡写真である。A：感染直後、B：感染8時間後、C：感染21時間後(約1日後)、D：感染31時間後(約1.5日後)、E：感染46時間後(約2日後)、F：感染70時間後(約3日後)。

図9はラット由来rWAR-1遺伝子を検出するオリゴヌクレオチドプローブを用いたラット各種組織におけるrWAR-1遺伝子の発現を示したノーザンハイブリダイゼーションの結果を示す電気泳動写真である。発現している組織では、約2.4Kbの2本の転写産物が検出されている。

図10はラット由来rWAR-1遺伝子を検出する1.9Kb EcoRIフラグメントをプローブとして用いたノーザンハイブリダイゼーションによって解析した結果

を示す電気泳動写真である。Lane 1：ラット幼若脳海馬組織 poly(A) mRNA；Lane 2：成熟ラット脳 poly(A) mRNA；Lane 3：ラット網膜 poly(A) mRNA。

図1はヒト脳由来の各部位から調製された poly(A) mRNAに対して、ヒト由来h W A R - 1 遺伝子を特異的に検出するDNAフラグメントをプローブとして用いたノーザンハイブリダイゼーションの結果を示す電気泳動写真である。各写真の右に記載した数字は、RNA分子量マーカーのサイズ(Kb)を示している。

#### 実施例

以下、実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

#### 実施例1

##### ラットcDNAライブラリーの作製

種々の新規なcDNAのクローニングを目的として、以下の手法により幼若ラットのcDNAライブラリーを作製した。

まず生後12日令の幼若ラットの組織を摘出し、常法によりグアニジンチオシアニ酸溶液を加えてホモゲナイズした後、塩化セシウム密度勾配遠心法により2mgの全RNAを調製した。

この全RNAをオリゴ(dT)セルロースカラム(ファルマシア社製)にかけることにより、ポリ(A)付加配列を有する103μgのmRNAを精製した。

このうち16μgのmRNAをオリゴ(dT)プライマー及びランダムプライマーを用いて、逆転写酵素によって一本鎖相補DNAを合成した。次いでRNase H及びE. coli DNAポリメラーゼIを反応させることにより、二本鎖cDNAを合成した。得られた二本鎖cDNAの末端を平滑化するためにT4

DNAポリメラーゼで処理し、両末端にEcoRIアダプターを付加した。最終的なcDNA量は、オリゴ(dT)プライマー及びランダムプライマーを用いた場合、各々2μgと1.3μgであった。その内の一部をλファージベクターであるλgt10のEcoRI切断部位に挿入後、インビトロパッケージングキット(ストラタジーン社製)によりλファージ粒子内に導入し、これを大腸菌C600<sup>hfr</sup>(ストラタジーン社製)に感染させることにより、目的とする幼若ラットcDNAライブラリーを調製した。plaque forming uni

t s (p f u) は、先にオリゴ (d T) プライマー及びランダムプライマーを用いて合成された c DNA 1 μg 当たり、各々 8. 8 × 10<sup>7</sup> p f u 及び 2. 5 × 10<sup>7</sup> p f u であった。

## 実施例 2

### 5 r WAR-1 をコードする c DNA 塩基配列の決定

実施例 1 で得られた c DNA ライブラリーよりランダムにクローンを選別し、通常のプレートライセート法により λ ファージ DNA を回収し、制限酵素 E c o R I で切断後、挿入 c DNA 部分を M 13 ファージベクターにサブクローニングした。そのうちの一つについて挿入 c DNA 部分の塩基配列を決定した結果、クローニングされた c DNA の長さは約 2. 2 K b であり、約 1 K b に亘りオープン・リーディング・フレームが存在していることが明らかとなつた。1. 8 K b からなる E c o R I 断片をプローブに用いて常法によりノーザン解析を行つた結果、この c DNA の対応 mRNA のサイズは 2. 4 K b 程度と推定されたため、p o l y (A) 配列の長さを加味すると、ほぼ全長の c DNA が得られたと予想された。得られたクローンをクローン 12 と命名した。クローン 12 の有する c DNA の塩基配列を GenBank データベースで検索したところ、ヒト由来の小胞体膜輸送関連タンパク質である TRAM (GenBank Accession No. X63679) と塩基配列上 59. 7%、アミノ酸配列上 57. 0% の相同性が認められ、また、KIAA0057 (GenBank Accession No. D31762) と塩基配列上 53. 7%、アミノ酸配列上 41. 0% の相同性が認められたが（表 1）、完全に一致する配列は見出されなかつたことから、クローン 12 の有する c DNA は新規な c DNA であることが明らかとなつた。この新規な c DNA によりコードされるタンパク質を、ラット WAR-1 (r WAR-1) と命名した。r WAR-1 の塩基配列及び推定上のアミノ酸配列を、配列番号：1 及び 2 に示した。また、公知のヒト TRAM (h TRAM) の塩基配列及びアミノ酸配列を、配列番号：5 および 6 に、また、ヒト KIAA0057 の塩基配列及びアミノ酸配列を、配列番号：12 および 13 に示した。

表 1

ヒト WAR-1、ヒト TRAM、ラット WAR-1 および KIAA0057 の

相同性 (%)

		ヒト WAR-1	ラット WAR-1	ヒト TRAM	KIAA 0057
ヒト WAR-1	塩基配列 (アミノ酸 配列)		72. 4 (72. 7)	76. 3 (70. 7)	64. 1 (44. 1)
ラット WAR-1	塩基配列 (アミノ酸 配列)	72. 4 (72. 7)		59. 7 (57. 0)	53. 7 (41. 0)
ヒト TRAM	塩基配列 (アミノ酸 配列)	76. 3 (70. 7)	59. 7 (57. 0)		69. 3 (51. 3)
KIAA 0057	塩基配列 (アミノ酸 配列)	64. 1 (44. 1)	53. 7 (41. 0)	69. 3 (51. 3)	

なお、上記 r WAR-1 の c DNA 断片をベクター p Blue script I I に組み込んだプラスミド、 p r WAR-1 を含有する大腸菌 E. coli DH 5 $\alpha$  ( p r WAR-1 ) は、茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている（微生物の表示： E. coli DH 5 $\alpha$  ( p r WAR-1 ) ; 受領日：平成 10 年 10 月 6 日；受託番号： FERM P-17018 ）。

### 実施例 3

#### h WAR-1 をコードする c DNA のクローニングと塩基配列の決定

r WAR-1 のオープン・リーディング・フレームに相当する 0. 8 K b からなる Eco RI - Xba I DNA 断片をプローブに用いて、常法により、ヒト c DNA ライブラリー（クロンテック社製）からヒト型 WAR-1 の c DNA を有するクローンのスクリーニングを行った。その結果、  $1 \times 10^6$  p f u のヒト c DNA ライブラリーから 1 クローンが単離された。塩基配列を決定した結果、実施例 2 で得られた r WAR-1 と塩基配列上 72. 4 % 、アミノ酸配列上 72. 7 % の相同性を示したため、これをヒト型 WAR-1 ( h WAR-1 ) をコードする c DNA であると結論した（表 1 ）。決定された塩基配列及び推定上のアミノ酸配列を、配列番号： 3 および 4 に示す。この h WAR-1 は、先の h TRAM と塩基配列上 76. 3 % 、アミノ酸配列上 70. 7 % の相同性を示し、 KIAA

A0057と塩基配列上64.1%、アミノ酸配列上44.1%の相同性を示した（表1）。

なお、上記hWAR-1のcDNA断片をベクターpBlue script IIに組み込んだプラスミド、p hWAR-1を含有する大腸菌E. coli DH5 $\alpha$ （p hWAR-1）は、茨城県つくば市東1丁目1番3号、工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている（微生物の表示：E. coli DH5 $\alpha$ （p hWAR-1）；受領日：平成10年10月6日；受託番号：FERM P-17019）。

これらhWAR-1、rWAR-1、hTRAM及びKIAA0057をコードするcDNAの塩基配列を比較した結果を、図1に示す。また、hWAR-1、rWAR-1、hTRAM及びKIAA0057のアミノ酸配列を比較した結果を、図2に示す。

#### 実施例4

##### 各種ヒト癌細胞樹立株におけるhWAR-1をコードする遺伝子の発現の検討

hWAR-1とhTRAMをコードする遺伝子のヒト各種癌細胞での発現を検討する目的で、hWAR-1 mRNAとhTRAM mRNAを各々特異的に増幅するプライマーを設定し、以下の条件にてRT-PCRを行った。

hWAR-1 mRNAを増幅するための5'側のプライマーとして、図1のhWAR-1の塩基配列の第823位～第846位（配列番号：7）の部分を用い、3'側のプライマーとして、第1093位～第1116位（配列番号：8）の部分を用いた。また、hTRAM mRNAを増幅するための5'側のプライマーとして、図1のhTRAMの塩基配列の第823位～第846位（配列番号：9）の部分を用い、3'側のプライマーとして、第1087位～第1110位（配列番号：10）の部分を用いた。

ヒト由来の癌細胞株として、子宮頸部癌細胞株HeLa、肺癌細胞株A549、膀胱癌細胞株T24、大腸癌細胞株SW480、グリア芽細胞腫株T98G、肝癌細胞株HePG2、ウィルムス腫瘍：腎癌細胞株G401、バーキットリンパ腫：Bリンパ腫細胞株Daudi、及びTリンパ腫細胞株MOLT4、Jurkatを用いた。これらの細胞株のうち、理研ジーンバンクより入手されるT24

細胞以外のものは全て、大日本製薬より入手し得る。

RT-PCRの反応は以下のように行った。

まず、上記各癌細胞株よりニッポンジーン社の全RNA精製キット (ISOG  
EN) を用いて、全RNAを調製した。この全RNA 4 μg (9. 5 μl) に  
5 対し、100mM DTT 2. 0 μl、5×First Strand Buffer  
f er (Gibco BRL社) 4. 0 μl、40U/μl RNasein (Promega社) 0. 5 μl、10mM dNTP 2. 0 μl、0. 2 μg/μ  
1 pd (N) <sub>6</sub>プライマー 1. 0 μl、200U/μl MMTV-RT (G  
ibco BRL社) 1. 0 μlを加え、37°Cで45分加温し、95°Cで5分  
間加熱することによって酵素を失活させた。次に、反応液から16 μlを分取し、  
H<sub>2</sub>Oを24 μl加えた。その内、2. 0 μlの反応液に10×PCR Buffer  
f er (Perkin Elmer社) 2. 5 μl、2. 0mM dNTP 2.  
5 μl、25 μM 各5'プライマー、25 μM 各3'プライマー、H<sub>2</sub>O 16.  
875 μl、及び5U/μl AmpliTaq Gold (Perkin El  
15 mer社) 0. 125 μlを加え、95°Cで9分加熱後、95°C 1分、60°C  
1分、72°C 2分の反応を35回行い、最後に72°Cで10分間加熱した後、  
反応液3 μlを2%アガロースゲル電気泳動に供した。結果を図3に示す。

hTRAMは全ての癌細胞で発現していることが確認されたが、hWAR-1  
では、Jurkat等でhTRAMよりも幾分発現の低いことが示され、hTR  
20 AM遺伝子の発現様式と異なることが示された(図3)。

#### 実施例5

##### ヒト正常組織におけるhWAR-1をコードする遺伝子の発現の検討

hWAR-1遺伝子とhTRAM遺伝子の組織での発現性を検討するために、  
以下の実験を行った。

まず、前記したhWAR-1特異的なプライマー配列(配列番号: 7及び8)  
を用いて実施例4と同様のRT-PCRを行うことにより、hWAR-1遺伝子  
の目的断片を增幅し、これをpT7Blue (R) T vector (Novagen社) にクローニングした。同様に、hTRAM特異的なプライマー配列  
(配列番号: 9及び10)を用いたRT-PCRによりTRAM遺伝子の目的断片

を増幅し、クローニングを行った。その後、これらのプラスミドを鋳型としてプライマー配列（配列番号：7及び8）を用いてRT-PCRを行い、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて増幅DNA断片を回収した。

次に、得られたDNA断片をマルチプライムラベル法により<sup>32</sup>Pで標識してプローブを調製し、Clontech社より購入したMTNプロットフィルター(human MTN blot I及びhuman MTN blot II)に対して常法によりハイブリダイゼーションを行った。また、コントロールプローブとしてClontech社より購入したβ-アクチンを用いた。図4、図5にそれぞれhWAR-1遺伝子とTRAM遺伝子の組織発現の結果を示す。hTRAMはあらゆる組織で発現しているのに対して（図5）、hWAR-1はリンパ系組織（脾臓、胸腺、白血球）、肺、肝臓などの組織では発現が認められなかった（図4）。先の実施例4の結果より、肺癌（A459）、Tリンパ腫（MOLT 4、Jurkat）、肝癌（HepG2）の各細胞株ではhTRAM遺伝子が発現していたことから（図3）、これらの組織においては癌化に伴ってhTRAMが発現していくことが示された。

また、得られたオートラジオグラムのバンドの強度を解析し、β-アクチンの強度を基準として、各臓器における発現性を検討した。検討した結果を、表2に示した。なお、示された数値は、精巣での発現を1.00とし、標準化した値である。

表2

組織	hWAR-1 / β-actin	組織	hWAR-1 / β-actin
心臓	0.56	脾臓	0.00
脳	1.47	胸腺	0.00
胎盤	0.00	前立腺	0.28
25 肺	0.00	精巣	1.00
肝臓	0.00	卵巣	0.25
骨格筋	0.00	小腸	0.15
腎臓	0.74	大腸	0.12
膵臓	1.21	末梢白血球	0.00

表2に明らかなように、hWAR-1遺伝子はrWAR-1と同様に脳での発現が最も高く、肺臓、腎臓、精巣の発現も比較的高いことが示された。

#### 実施例6

##### 組換えコスミドベクターの作製

hWAR-1をコードするcDNA遺伝子（配列番号：3）の開始コドンのATG配列の36塩基対上流のPvuII切断部位から終始コドンTAAから139塩基対下流のDraI切断部位までの約1.3KbのDNA断片を用いて、hWAR-1のセンス鎖、アンチセンス鎖が挿入されたコスミドベクターを作製した。具体的には、SwaIで切断したpAxCAwtコスミドベクター（Kanegae et al., 1995, Nucleic Acid Res., 23, 3816-3821に記載、またAdenovirus Expression vector kitとして宝酒造より購入可能）に、前記hWAR-1 1.3Kb PvuII/DraI断片を連結後、挿入断片を含まないコスミドベクターをSwaIで消化し、反応液の一部を常法によりインビトロパッケージングした。大腸菌DH5 $\alpha$ に感染後、出現したコロニーからコスミドDNAを回収し、EcoRI/XhoIで切断後、1%アガロースゲル電気泳動にて解析した。その結果、センス鎖RNAを発現するクローンが9種、アンチセンス鎖を発現するクローンが6種得られた。その内各々3種を選別し、センス鎖のRNAを発現するものは、EcoRI/XbaIまたはBglIIによって、またアンチセンス鎖のRNAを発現するものは、SstI/XbaIまたはEcoRI/XhoIにより切断し、DNA断片の方向性の確認と挿入断片に異常のないことを確認した。

#### 実施例7

##### 組換えアデノウイルスの作製

ヒトアデノウイルス5型由来非増殖型組換えアデノウイルスベクター（E1及びE3遺伝子を欠失）のE1遺伝子欠失部位に、実施例6で作製したhWAR-1遺伝子（センス/アンチセンス）の発現単位を挿入した組換えアデノウイルスベクターを作製するために、以下の操作を行った。なお、プロモーターは高発現プロモーターとして特開平3-168087号公報に開示されているCAGプロ

モーターを用い、また組換えアデノウイルスの作製は既存の方法 (Miyake et al., Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 93, 1320-1324 (1996)、及び特開平7-298877) に従った。

アデノウイルスのE1遺伝子欠失部位にCAGプロモーターのみが挿入された組換えアデノウイルスベクター AxC Aw t (Kanegae et al., 1995, Nucleic Acid Res., 23, 3816-3821に記載、また Adenovirus Expression vector kitとして宝酒造より購入可能) から、既存の方法 (特開平7-298877) に従いウイルスDNA-末端蛋白質複合体を調製し、制限酵素Eco T 22 I 及びC1a Iで同時消化した。この制限酵素消化ウイルスDNA-末端蛋白質複合体と、実施例6で作製したhWAR-1センス鎖、もしくはアンチセンス鎖を挿入したコスミドベクターとを用い、リン酸カルシウム共沈法で293細胞を形質転換した。生じた組換えアデノウイルスをクローニング後、ウイルスDNAをXho I 及びC1a Iで消化することより目的ウイルスを選別し、組換えアデノウイルスベクターAxC AWAR1-L (センス鎖) とAxC AWAR1-R (アンチセンス鎖)を得た。この組換えウイルスを継代した4次ウイルス液の力価を既存の方法 (特開平7-298877) により測定し、以後の実験に用いた。

#### 実施例8

##### 組換えアデノウイルスベクター感染によるhWAR-1遺伝子の発現

実施例7で作製したアデノウイルスベクターAxC AWAR1-L またはAxC AWAR1-R、およびAxC Aw t (コントロールウイルス) をヒトグリア芽細胞腫株T98Gに重複感染度10で37°C、1時間感染させ、その後5% FCS含有最小栄養培地で培養した。感染翌日に培地を低血清培地 (0.5% FCS) に交換した。感染2日後において、いずれのアデノウイルスベクターを感染させた細胞においても、培地のみで感染操作を行った細胞と比べて変性しており、アデノウイルス感染の影響が若干認められたものの、センス鎖を発現するAxC AWAR1-Lを感染させた細胞にのみ顕著な形態変化が観察された (図6)。また、AxC AWAR1-R感染細胞の形態はAxC Aw t 感染細胞と差は認められなかった。さらに、AxC AWAR1-Lを感染させたT98G細胞

は、感染3日後より細胞死を起こし始めた。

#### 実施例9

##### WAR-1センスRNA発現によるT98G細胞の形態変化

形態の変化を観察し易いように感染時の細胞密度を低くし（実施例8におけるコンフルエント状態の細胞の約1/10の細胞密度）、アデノウイルスベクターA x C A W A R 1 - L（センス鎖）またはA x C A W A R 1 - R（アンチセンス鎖）、およびA x C A w t（コントロール）を実施例8と同様にT98G細胞に感染させ、細胞の形態変化を経時的に観察した。感染翌日にはコントロールであるA x C A w t 感染細胞においても、培地のみで感染操作を行った細胞と比べて変性し始めており、アデノウイルス感染による影響が若干認められた（図7）。

しかし、A x C A w t 感染細胞と比べて、hWAR-1のセンス鎖を発現するA x C A W A R 1 - Lを感染させた細胞は、感染翌日（感染21～31時間後）には顕著な形態変化が観察され、感染3日後には細胞死を迎える始めた（図8）。なお、アンチセンスRNAを発現するA x C A W A R 1 - R感染細胞の形態は、A x C A w t 感染細胞と差は認められなかった。

#### 実施例10

##### WAR-1タンパク質添加によるT98G細胞の形態変化

WAR-1タンパク質を、あらかじめリポソームに封入したり、リピッドを結合させることにより、細胞膜への透過性を増しておく。また、タンパクのC末端に小胞体保持配列であるL y s - A s p - G l u - L e u（KDEL）を付加したりすることにより、細胞質に取り込まれたタンパク質を小胞体に輸送できるようになる。このような処理を施した本発明のタンパク質を、実施例8及び9で用いたT98Gの培養液中に添加後、数日間培養する。その後、T98Gの細胞数や細胞の形態変換を観察することにより、癌細胞増殖阻害活性を測定することができる。また、<sup>3</sup>Hで標識されたチミジンの取り込み能の低下を測定すること（Nagase et al., Int. J. Cancer, 65, 620-626, 1996）によっても、癌細胞の増殖阻害活性を測定することができる。

#### 実施例11

##### ラットWAR-1遺伝子の組織発現の検討

r WAR-1 遺伝子を特異的に検出するオリゴヌクレオチドプローブを用いて Clontech 社より購入したラット MTN プロットフィルターに対してハイブリダイゼーションを行った。用いたプローブの塩基配列は、配列番号： 11 に記載した ATTTCTGTGCCCTTCGACCTGGACCGTCTTCCTCCCACAGACA である。ハイブリダイゼーションの条件は、 Clontech 社のプロトコールに従った。その結果、図 9 に示されるように、 r WAR-1 遺伝子は、脳で強く発現していた。また、精巣での発現が認められ、肺、腎臓での発現は微弱であった。

#### 実施例 1 2

##### ヒト及びラットWAR-1の神経関連部位での発現の検討

r WAR-1 遺伝子をプローブとして 1.7Kb の EcoRI 断片を用いて幼若ラット脳海馬組織より常法により調製した poly(A) mRNA 及び Clontech 社より購入した成熟ラット脳並びに網膜の poly(A) mRNA に対してノーザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、図 10 に示されるように網膜でも発現が認められた。検出されたバンドの強度が低いのは poly(A) mRNA が幾分分解を受けているためと考えられる。

また、実施例 5 で用いた h WAR-1 を検出するプローブを用いて Clontech 社より購入した MTN プロットフィルター (human brain MTN blot II 及び III) に対してハイブリダイゼーションを行った ( 図 11 ) 。その結果、脳内のどの部位においても h WAR-1 の発現が認められた。

また、脊髄においても本遺伝子の発現が認められた。このことより、末梢における神経部位においても h WAR-1 遺伝子が発現していることが示唆された。

#### 実施例 1 3

##### 組換えアデノウイルスベクター感染細胞の培養上清を用いた PC12 細胞に対する神経突起伸長作用の検討

実施例 7 で作製したアデノウイルスベクター A x CAWAR1-L または A x CAWAR1-R 、もしくは A x CAwt ( コントロールウイルス ) をヒトグリア芽細胞腫株 T98G に重複感染度 10 で 37°C 、 1 時間感染させ、その後 5% FCS 含有最小栄養培地で培養した。また、ネガティブコントロールとして非神経系培養であるヒト肺癌由来 A549 細胞に対しても同様のウイルス感染実験を

染2日後の各々の培養上清を回収し、遠心後、上清を0.22ミクロン孔のメンブレンフィルターを通して細胞の残骸を除去した。

得られた培養上清は、場合によってアミコン社のセントリプレップ（3000Kdカット）を用いて5倍に濃縮した。

5 96穴コラーゲンコートプレートに1ウェルあたり $100\mu l$ のDMEM-10%FCS培地で $1 \sim 5 \times 10^4$ 細胞/mlとなるようPC12細胞を撒き込み、4日間培養を続けた。培養上清をすて、組換えアデノウイルス感染細胞の培養上清を表3及び表4に示したように最終容量が約 $100\mu l$ となるように添加した。また、培養中の血清濃度は最終10%FCSとした。添加した試料として、培地(Medium)、非感染細胞の培養上清(Mock)、AxCAWAR1-L感染細胞の培養上清(WAR(+))、AxCAWAR1-R感染細胞の培養上清(WAR(-))、及びAxCawt感染細胞の培養上清(Control)を用いた。アッセイ系のポジティブコントロールとして、 $10\mu l$ の500ng/ml  $\beta$ -NGFを添加した。

15 培養上清添加後、2日間培養を続けPC12細胞の神経突起伸長作用を顕微鏡下で観察した。その結果、表3に示されるようにhWAR-1のセンス鎖を発現するアデノウイルスを感染させたT98G細胞の培養上清をPC12に添加した場合にのみ、強い神経突起伸長作用が認められた。また、A549細胞の培養上清を用いた実験では何れの場合も神経突起伸長作用は認められなかった。更に、表4に示された結果から、神経突起伸長作用を起こすのに必要なAxCAWAR20 1-L感染細胞の培養上清は $50\mu l$ 以上であれば良いことが確認された。

以上の結果は、WAR-1遺伝子の発現により、T98G細胞の產生する神経栄養因子の細胞外への分泌が促進されたことを明らかに示すものである。表2は、アデノウイルス感染T98G及びA549細胞の培養上清を用いたPC12アッセイの結果(感染細胞培養上清 $100\mu l$ 添加)を示す。表3中、+++、++、+、-はこの順に、PC12細胞の神経突起伸長が大きいことを示す。

表3

	$\beta$ -NGF	T98G	A549
Medium	—	—	—
Mock		+	—
Control		+	+
WAR(—)		+	+
WAR(+)		++	+
$\beta$ -NGF	+++		

表4は、アデノウイルス感染T98G細胞の培養上清を用いたPC12アッセイの結果を示す。表4中、+++、++、+、-/+、—はこの順に、PC12細胞の神経突起伸長が大きいことを示す。

5

表4

	$\beta$ -NGF	濃縮培養上清( $\mu$ l)			培養上清( $\mu$ l)		
		50	30	20	100	50	30
Medium	—	—	—	—	—	—	—
Mock		-/+	-/+	-/+	-/+	-/+	-/+
Control		++	+	+	+	+	+
WAR(—)		-/+	+	+	-/+	++	-/+
WAR(+)		++	++	++	++	++	+
$\beta$ -NGF	+++						

### 産業上の利用の可能性

本発明のDNAは、癌細胞増殖阻害効果を示すWAR-1をコードするもので  
あり、該DNAにコードされるWAR-1ポリペプチドを細胞内で產生または產  
生誘導させることにより、癌細胞の増殖を阻害し、癌細胞に細胞死を起こさ  
くことができる。本発明はこのようなWAR-1の効果に基く新しい癌治療方法を  
提供することができる。

10

また、本発明の小胞体膜タンパク質WAR-1遺伝子にコードされるWAR-1ポリペプチドを細胞内で産生または、産生誘導させることにより、中枢及び末梢神経変性疾患領域において神経細胞の脱落を防ぎ、更に細胞死を迎える直前の細胞を活性化し正常な神経伝達機能を回復させるに有用な複数の神経栄養因子の分泌を同時に促進することができる。本発明により、神経変性疾患に対する新しい治療方法が提供される。

## 請求の範囲

1. 以下の (a) 又は (b) のタンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号 : 2 又は配列番号 : 4 に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質

5 (b) 配列番号 : 2 又は配列番号 : 4 に記載のアミノ酸配列のうち 1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質

2. 以下の (c) 又は (d) のDNA。

(c) 配列番号 : 1 又は配列番号 : 3 に記載の塩基配列からなるDNA

10 (d) 前記 (c) のDNAとストリングエントな条件下でハイブリダイズし、かつ癌細胞の増殖阻害活性を有するタンパク質をコードするDNA

3. 配列番号 : 1 又は配列番号 : 3 に記載のDNAの全部又は一部をプローブに用いて染色体DNAライブラリーからクローニングされる、請求項 2 記載のDNA。

15 4. プロモーター領域を含むことを特徴とする、請求項 3 記載のDNA。

5. 受託番号 F E R M B P - 6 9 1 0、又は受託番号 F E R M B P - 6 9  
1 1 で表示される微生物が有する、請求項 1 又は 2 記載のDNA。

6. 請求項 1 ~ 5 いずれか記載のDNAを発現することによって得られるタンパク質。

20 7. 請求項 1 ~ 5 いずれか記載のDNAを含有する組換え発現ベクター。

8. 請求項 1 ~ 5 いずれか記載のDNAを含有する組換えアデノウイルスベクター。

9. 請求項 7 又は 8 記載の組換え発現ベクターによって形質転換された形質転換細胞。

25 10. 請求項 1 ~ 5 いずれか記載のDNAの全部又は一部よりなる 1 本鎖又は 2 本鎖DNAであって、かつ配列番号 : 1 又は配列番号 : 3 に記載の塩基配列よりなるDNAの発現を特異的に検出し得る、ハイブリダイゼーションプローブ又はPCRプライマー用のDNA。

11. 以下の配列よりなる、請求項 10 記載のDNA。

5' 側プライマー配列；5'-CACCTGGCTGGATCGCAGAACGG-3' (配列番号：7)

3' 側プライマー配列；5'-CTCTTCCTCTTGGCGGACAGTC-3' (配列番号：8)

12. 請求項10又は11記載のDNAを、ハイブリダイゼーションプローブ又はPCRプライマーとして用いることを特徴とする、配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列よりなるDNAの発現の検出方法。

13. 請求項6記載のタンパク質に結合する抗体。

14. 請求項13記載の抗体を用いることを特徴とする、配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列よりなるタンパク質の発現の検出方法。

15. 請求項12又は14記載の検出方法よりなる、癌の診断方法。

16. 請求項1～5いずれか記載のDNA、又は請求項6記載のタンパク質のいずれかを有効成分として含有する医薬。

17. 配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列よりなるDNAの発現を増加させることを特徴とする、癌細胞増殖阻害剤。

18. 請求項1～5いずれか記載のDNAを有効成分とする、癌細胞増殖阻害剤。

19. アデノウイルスベクターを用いることを特徴とする、請求項18記載の癌細胞増殖阻害剤。

20. 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNAを有効成分とする神経栄養因子分泌促進剤。

(a) 配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列のうち1若しくは数個または複数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列となり、かつ神経栄養因子の分泌促進活性を有するタンパク質。

21. 以下の(c)又は(d)のDNAを有効成分とする神経栄養因子分泌促進剤。

(c) 配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNA。

(d) 前記(c)のDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ神経栄養因子の分泌促進活性を有するタンパク質をコードするDNA。

22. 配列番号：1又は配列番号：3に記載のDNAの全部又は一部をロー

ブに用いて染色体DNAライブラリーからクローニングされるDNAを有効成分とする、請求項21記載の神経栄養因子分泌促進剤。

23. プロモーター領域を含むことを特徴とするDNAを有効成分とする、請求項22記載の神経栄養因子分泌促進剤。

5 24. 受託番号FERM BP-6910、又は受託番号FERM BP-6  
911で表示される微生物が有するDNAを有効成分とする、請求項20又は2  
1記載の神経栄養因子分泌促進剤。

25. DNAが組換え発現ベクターに含まれていることを特徴とする、請求項  
20～24いずれか記載の神経栄養因子分泌促進剤。

10 26. DNAがアデノウイルスベクターに含まれていることを特徴とする、請  
求項25記載の神経栄養因子分泌促進剤。

27. 以下の(a)又は(b)のタンパク質を有効成分とする神経栄養因子分  
泌促進剤。

(a) 配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質

15 (b) 配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列のうち1若しくは数  
個または複数個のアミノ酸が欠失、置換及び／又は付加されたアミノ酸配列から  
なり、かつ神経栄養因子の分泌促進活性を有するタンパク質。

28. 以下の(c)又は(d)のDNAによってコードされるタンパク質を有  
効成分とする神経栄養因子分泌促進剤。

20 (c) 配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列からなるDNA。

(d) 前記(c)のDNAとストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、か  
つ神経栄養因子の分泌促進活性を有するタンパク質をコードするDNA。

29. 受託番号FERM BP-6910、又は受託番号FERM BP-6  
911で表示される微生物が有するDNAによってコードされるタンパク質を有  
効成分とする、請求項27又は28記載の神経栄養因子分泌促進剤。

30. 配列番号：1又は配列番号：3に記載のDNAの発現を増強する物質ま  
たは配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質の  
産生を増強する物質を有効成分とする神経栄養因子分泌促進剤。

31. 請求項20～30いずれか記載の神経栄養因子分泌促進剤を含有する神

経変性疾患治療剤。

3 2. 配列番号：1又は配列番号：3に記載の塩基配列よりなるDNAの発現を増強すること、または配列番号：2又は配列番号：4に記載のアミノ酸配列からなるタンパク質の産生を増強することを特徴とする、神経栄養因子の分泌促進方法。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1 / 15

☒ 1

HTRAM. DNA	1	ATGGCGATT	GCAAGAAAG	CACCAAGAGC	CCCCCAGTGC	TGAGCCACGA	50
KIAA0057. DNA	1	ATGGCTTTCG	GCAcGAGGA-	--CGAAAGT	TACCCGCTC	TGAGCCAGGA	50
HWAR1. DNA	1	ATGGGGCTCC	GTAAGAAGAG	CACCAAGAAC	CCCCCCTGTTC	TGAGCCAGGA	50
RWAR1. DNA	1	ATGGGCTCC	GCAAGAAGAA	CGCCAGGAAC	CCCCCGTGC	TGAGCCACGA	50
HTRAM. DNA	51	ATTCTGTCCTG	CAGAAATCACG	CGGACATTCGT	CTCCCTGTTGT	GGGATGCTCT	100
KIAA0057. DNA	51	GTTCGTCATC	CACAAACCAG	CGGACATTCGG	CTTCCTGCCG	GGGCTCTGGG	100
HWAR1. DNA	51	ATTCAATCCCTG	CAGAAATCACG	CGGACATTCGT	CTCCCTGGTG	GGGATGCTCT	100
RWAR1. DNA	51	ATTCAATGGTG	CAGAAACCAG	CGGATATGGT	CTCCCTGGTG	GGCATGTTCT	100
HTRAM. DNA	101	TCCTGCTGGG	GCTCATGTT	GAGATAACGG	CAAAGCTTC	TATCATTTT	150
KIAA0057. DNA	101	TCCTCATCGG	GCTTATGTTTC	GAGGTGACAG	CCAAGACTTC	CTTTCTATT	150
HWAR1. DNA	101	TCCTGCTGGG	GCTTCGGTTTC	GAGGGAAACAG	CAGAAGCATC	CATCGTGTTC	150
RWAR1. DNA	101	TCGTGCTGGG	ACTTATGTTTC	GAGGGAAACGG	CCGAGATGTC	GATCGTGTTC	150
HTRAM. DNA	151	GTTACTCTTC	AGTACATGT	CACCCCTCCA	GCAACAGAAG	AACAAGCTAC	200
KIAA0057. DNA	151	ATTTAACCTC	AGTATAACAT	TAGGCTGCCCT	ACAGGAGA--	-----CAG	200
HWAR1. DNA	151	CTCACTCTTC	AGCACAGSTGT	TGCTGTCCCT	GCAGGAGAGG	AACAAAGCCAC	200
RWAR1. DNA	151	CTCAACCCTGC	AGCATGGAGT	CGTTGTCCC-	--AGCGGAAG	GGCTAACCTC	200
HTRAM. DNA	210		170	180	190	200	
KIAA0057. DNA	201	TGATATCACTG	TCCCTTATT	ACTATGGCAT	CAAAGATTTG	GCTACTGTTC	250
HWAR1. DNA	201	TGAGACCGTG	--CACTACC	ACTATGGCC	TAAGGACCTG	GTACACATCT	250
RWAR1. DNA	201	GGGOTCAAAG	TCCCTTATT	ATATGGTGT	CAAAGATTTG	GCCACGGTT	250
HTRAM. DNA	260		220	230	240	250	
KIAA0057. DNA	201	TGGGTCCAGG	ACCCTTACCC	ATATGGGGT	CAAAGATCTG	GCCACAGTGT	250
HWAR1. DNA	201						
RWAR1. DNA	201						
HTRAM. DNA	251	TCTTCTACAT	GCTAGTGGCG	ATATAATTTC	ATGCCGTAAAT	TCAAAGAGTAT	300
KIAA0057. DNA	251	TGTCTCAT	CTTCATCACC	ATCATCTTGC	ATGCTGTGGT	TCAGGAGTAC	300
HWAR1. DNA	251	TCTTCTACAT	GCTGGTGGCA	ATCATTTTC	ATGCCCAAT	TCAGGAATAT	300
RWAR1. DNA	251	TCTTCTACAT	GCTGGTGGCC	ATCATCTTC	AGGCCACCAT	TCAGGAGTAC	300
HTRAM. DNA	310		320	330	340	350	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2 / 15

## 図 1 (続)

HTRAM.DNA	301	ATGTTGATA	AAATTAAACAG	GCGAATGCAC	TTCCTCAAAA	CAAACACAG	350
KIAA0057.DNA	301	ATTTTACATA	AAATCAGCAA	ACGGGTTCAT	CTCTCCAAAG	TCAAAACACAG	350
HWAR1.DNA	301	GTGTTGGATA	AAATTAAACAA	GAGAATGCAC	TTCAACCAAA	CGAAACAAAA	350
RWAR1.DNA	301	GTGCTAGATA	AGCTCACGCC	GAGACTGCAC	CTCACCAAC	GCAACAAAA	350
HTRAM.DNA	360		370	380	390	400	
KIAA0057.DNA	351	CAAGTTAAC	GAATCTGGTC	AGCTTAGTGC	GTTCTACCTT	TTTGCCCTGTG	400
HWAR1.DNA	351	CAAGTTCAAT	GAATCTGGAC	AGCTGGTGT	CTTTCATTC	ACCTCGGTCA	400
RWAR1.DNA	351	CAAGTTAAC	GAGTCTGGTC	AGTITAGTGT	GTTCTACTTT	TTTCTCTGTA	400
HTRAM.DNA	351	CAAATTGAAT	GAGGCCGGCC	AGCTGAGTGT	GTTCTACATA	GTGTCCTGGTA	400
HTRAM.DNA	401	TTTGGGGCAC	ATTCAATTCTC	ATCTCTGAAA	ACTACATCTC	AGACCCAACT	450
KIAA0057.DNA	401	TTTGGTGGCTT	CTAACCTGGTG	GTGACGGAA	GATACTTAAC	AAACCCAAAGA	450
HWAR1.DNA	401	TTTGGGCAC	ATTCAATTTA	ATCTCTGAAA	ACTGCCTGTC	AGACCCAACT	450
RWAR1.DNA	401	TCTGGGTAT	GATCAATTCTG	GCCTCTGAGA	ACTGCCTGTC	AGACCCAACT	450
HTRAM.DNA	410		420	430	440	450	
KIAA0057.DNA	451	ATCTTATGGA	GGGTATTC	CCATAAACCTG	ATGACATTT	AAATGAAGTT	500
HWAR1.DNA	451	AGCCCTCTGGG	AAAGACTAACCC	GCATGTGCAC	CTCCCTTTC	AGCTGAAGTT	500
RWAR1.DNA	451	CTTATATGGA	AGGCTCGTCC	CCATAGCATG	ATGACATTT	AAATGAAGTT	500
HTRAM.DNA	451	CATATGTGGA	AGTCTCACGCC	CCACAAACATG	ATGACATTT	AGATGAAGTT	500
HTRAM.DNA	510		520	530	540	550	
KIAA0057.DNA	501	TTTCTACATA	TCACAGCTGG	CTTACTGGCT	TCATGCTTT	CCTGAAACTCT	550
HWAR1.DNA	501	TTTCTACATA	TGCCAGCTGG	CCTACTGGCT	GCACGGACTT	CCTGAGCTAT	550
RWAR1.DNA	501	TTTCTACATA	TCCCAGCTGG	CTTACTGGCT	TCATGCTTT	CCTGAACTCT	550
HTRAM.DNA	560		570	580	590	600	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

3 / 15

## 図 1 (続)

HTRAM. DNA	551	ACTTCCAGAA	AACCAAAAAA	GAAAGATTC	TTCGTCACCT	TGTCTACATT	600
KIAA0057. DNA	551	ACTTCCAGAA	GTACGGAAAG	GAGGAATTTC	CGCGCCACCT	CCAGTATATT	600
HWAR1. DNA	551	ACTTCCAGAA	AACCAAAAAA	GAAGAACATCC	TTCGTCACCT	TGTCTACATT	600
RWAR1. DNA	551	ACTTCCAGAA	AGTCAGGAAA	GAAGATATCC	GGGGTCAACT	CATCTACATT	600
HTRAM. DNA	610						
KIAA0057. DNA	601	GGTCTTACC	TCTTCCACAT	TGCTGGAGCT	TACCTTTGAA	ACTTGAATCA	650
HWAR1. DNA	601	TGCCTGACC	TGGTCAATAT	AGCTGGAGCA	TACCTCTTAA	ACCTGAGCCG	650
RWAR1. DNA	601	GGTCTCACC	TCTTCCACAT	TACTGGAGCT	TAICCTCTTGT	ACTTGAATCA	650
HTRAM. DNA	660						
KIAA0057. DNA	651	TCTAGACTT	GTTCCTCIGG	TGCTACATA	TTTGTGTTGAA	TTTCTTTTCC	700
HWAR1. DNA	651	CCTGGCCCTG	ATCTTGCTGC	TGCTGCAGTA	CTCAACTGAG	TTCCCTTCC	700
RWAR1. DNA	651	CCTGGCCCTG	CTTCTTTFGG	TACTGCATTA	TTPTGTTGAA	TTACTTCCC	700
HTRAM. DNA	710						
KIAA0057. DNA	701	ACATTTCGG	CCTGTTTAT	TTTACCAATG	AAAAGTATCA	GAAGGATT	750
HWAR1. DNA	701	ACACGGCTAG	ACTCTCTCAC	TTTGCAGATG	AAAACAAGA	GAAAACTGTC	750
RWAR1. DNA	701	ACATGTGCCG	CCTGTTTAC	TTTACTGATG	AAAAGTACCA	GAAGGCATA	750
HTRAM. DNA	760						
KIAA0057. DNA	751	TCTCTGGG	CAGTTCTTT	TGTTTGGGA	AGACTCTGAA	CTTAAATTCT	800
HWAR1. DNA	751	AGTGCCTGGG	CTGCTGTTT	TCGGGTACC	CCCTCTICA	TCCTCACCCCT	800
RWAR1. DNA	751	TCTCTGGG	CCATTGTGTT	TAICCTGGG	AGACTCTGAA	CTTPATTGT	800
HTRAM. DNA	810						
KIAA0057. DNA	801	TTCAGTACTC	ACTGTTGGT	TTGGCCTGC	AAGACCGAAA	AAATCAGAAC	850
HWAR1. DNA	801	TGCCGTGCTG	GCATTTGGCT	TTGGACTGGC	TGGCATGAA	AACCPGGCAT	850
RWAR1. DNA	801	TTCCGTACTC	ACTGTTGGGT	TTCACCTGGC	TGGATGGAG	AATCAGAAC	850
HTRAM. DNA	860						
KIAA0057. DNA	860	CTCAGTGGT	ADAGTAGGGC	TTCACTTGGC	CGGGACAT---	AAATCAGAAC	850
HWAR1. DNA							
RWAR1. DNA							

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4 / 15

## 図 1 (続)

HTRAM. DNA	851	TG GAT TT CAG	TACTGGAAAC	TTC AAT GTGT	TAG CT GT TAG	AAT CG CT GTT	900
KIAA0057. DNA	851	TT GAT TCCGA	GAAAEGGAAC	TTC AAC ACAT	TGTTTTGCAG	GCT CT GG GTG	900
HWAR1. DNA	851	CTG AT GC CCT	TACTGGAAAT	GTA AAT GTGT	TGG CAG CTA	AAT TGC GTT	900
RWAR1. DNA	851	GAAT GTCTT	C TCT GGTAAT	GTC AAT GTGT	TGG CAG CTA	AAT CG CT GTT	900
HTRAM. DNA	910			920	930	940	950
KIAA0057. DNA	901	CT GCA TCCA	TTT GCG TAC	TCA GGC ATT	AT GAT GTG GA	ACT CATT AA	950
HWAR1. DNA	901	CTG CT GCT GG	TGT GRC CGC	CCAGGGCTGG	CTCAT GTGGC	GCT TCAT CCA	950
RWAR1. DNA	901	CTG TCG TCA	GTT GCA CGAT	CCA AG CCT AC	GTA AAC ATGG	ACT TA ATT AC	950
HTRAM. DNA	960			970	980	990	1000
KIAA0057. DNA	951	TTT TCA GCT	CGA AGGTGG	GGG AAC ATTC	TGCT TTT CAG	-GCAC CAG CT	1000
HWAR1. DNA	951	CT CCC AGCTG	CGG CA TGG C	GG GAA TACT G	GAAT GAC CAG	AGT GCA AAG C	1000
RWAR1. DNA	951	TCT CT GCT T	CA GAG GTGG	TAC AGATTC	TAAT ATT CAG	-GCCT CAT GT	1000
HTRAM. DNA	1010			1020	1030	1040	1050
KIAA0057. DNA	1001	GT GAA GAA GAA	AACCA - ACAG	TAACT AA - AG	GCAG AT CTC	TAAAAAAGGA	1050
HWAR1. DNA	1001	GGAG GAT CCC	AGCC CA ACC	AGACT ACC AG	CCAGG CT CAT	CAA AGGGAA	1050
RWAR1. DNA	1001	AT GAA AAA GAA	AAC - - - - G	TC - - - -	- AGAT CTC	TAAAAAAGGA	1050
HTRAM. DNA	1060			1070	1080	1090	1100
KIAA0057. DNA	1051	ACAG AAA ATG	GT GT GAA TGG	AAC AT TAACT	TCAAAT GTAG	CAG ACT CTC	1100
HWAR1. DNA	1051	TCT GTT ACC	AT GAA AAATGG	AGT GCT GAA G	GCAG GAG AC	GAAC CT CCC	1100
RWAR1. DNA	1051	ACAG AAA AC	GAG TG --- GG	AGT GGA AACT	TCAAAT AGAC	TAG ACT GTCC	1100
HTRAM. DNA	1110			1120	1130	1140	1150
KIAA0057. DNA	1101	CC GCA TAAA	AAAGAGAAAT	CT TCA . . . . .	. . . . .	. . . . .	1150
HWAR1. DNA	1101	AC GCA TAA C	AA ACT CAA GT	CT CC C . . . . .	. . . . .	. . . . .	1150
RWAR1. DNA	1101	CC CAA AG G	AAAGAGAAAT	CT TCA . . . . .	. . . . .	. . . . .	1150

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

5 / 15

☒ 2

HTRAM . AMI	1	M A I R K K S T K S	P P V L S H E F V L	Q N H A D I V S C V	A M V E L L G L M F	E I T A K A S I I F	50
KIAA0057 . AMI	1	M A F F R R - T K S	Y P L F S Q E F V I	H N H A D I G F C L	V L C V I L G L M F	E V T A K T A F L F	50
HWAR1 . AMI	1	M G I R K K S T K N	P P V L S Q E F I I	Q N H A D I V S C V	G M F F I L G I V F	E C T A E A S I V F	50
RWAR1 . AMI	1	M G I R K K N A R N	P P V L S H E F M V	Q N H A D M V S C V	G M F F V L G L M F	E G T A E M S I V F	50
HTRAM . AMI	51	V T L Q Y N V T I P	A T E E Q A T E S V	S L Y Y G I K D I	A T V F Y M L V A	I I I H A V I Q E Y	100
KIAA0057 . AMI	51	I L P Q Y N I S V P	T A D S E T V H --	-- Y H Y G P K D L	V T I L E Y I F I T	I I I H A V V Q E Y	100
HWAR1 . AMI	51	L T L Q H S V A V F	A A E Q A T G S K	S L Y Y G V K D L	A T V F Y M L V A	I I I H A T I Q E Y	100
RWAR1 . AMI	51	L T L Q H G W V F	A E G L P S G S R	T I Y H Y G V K D L	A T V F Y M L V A	I I I H A T I Q E Y	100
HTRAM . AMI	101	M L D K I N R F M H	F S K T K H S K E N	E S Q G L S A E Y L	F A C V I G T F I L	I S E N Y I S D P T	150
KIAA0057 . AMI	101	I L D K I S K R L H	L S K V K H S K E N	E S Q G I W W F H F	T S V I W C F Y Y V V	V T E G Y I T N E R	150
HWAR1 . AMI	101	V L D K I N K R M Q	F T K A K Q N K E N	E S Q G F S V Y F F	F S C I W G T F I L	I S E N C L S D P T	150
RWAR1 . AMI	101	V L D K I L S R R L Q	L T K G K O N K L N	E A G Q L S V F Y I	V S G I W G M I I I	A S E N C L S D P T	150
HTRAM . AMI	160			170	130	140	150
KIAA0057 . AMI	160						
HWAR1 . AMI	160						
RWAR1 . AMI	160						
HTRAM . AMI	151	I L W R A Y P H N L	M T F Q M K F Y I	S Q L A Y M L H A F	P E L Y F Q T K K	E D I P R O L V Y I	200
KIAA0057 . AMI	151	S I W E D Y P H V H	L P F Q V K F F Y L	C O L A Y M L H A L	P E L Y F Q V R K	E E I P R Q L Q Y I	200
HWAR1 . AMI	151	I L W K A R P H S M	M T F Q M K F Y I	S Q L A Y M E H A F	P E L Y F Q T K K	Q D I P R Q L V Y I	200
RWAR1 . AMI	151	L L W K S Q P H N M	M T F Q M K F Y I	S Q L A Y M E H S F	P E L Y F Q V R K	Q D I F G O I I Y I	200
HTRAM . AMI	210			220	230	240	250

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

6 / 15

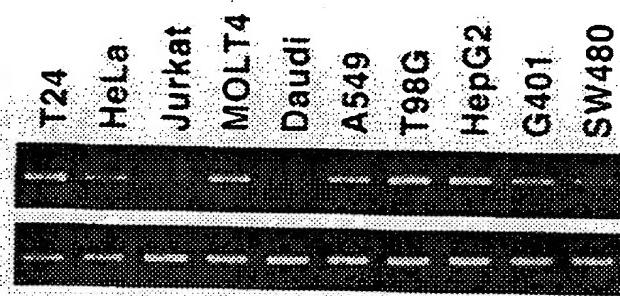
## 図 2 (続き)

HTRAM .AMI	201	GLYLFHTAGA	YIINLNHIGI	VILVILHYFVE	FLEFHISRLFY	FSNEKYQKGF	250
KIAA0057 .AMI	201	CLYIVHTAGA	YIINLNHIGI	LLILQYSTE	FLEFHSTARIFY	FADENNEKLIF	250
HWAR1 .AMI	201	GLHLFHITGA	YIILYLNHIGI	LLILVLYFVE	LISHEMCGLFY	ESDEKYQKGI	250
RWAR1 .AMI	201	GLHLFHICCA	YIILYLNHIGI	LLIMLYHAYE	LISSVCSILY	EGDERYQKGL	250
	260			270	280	290	300
HTRAM .AMI	251	SLWAVLFLVG	RILTLTISVL	TVC GeflarE	NOKLDEFSTGN	ENVLA VRTAY	300
KIAA0057 .AMI	251	SLWAVLGVF	RIFLTTLAVI	AIC GeflarME	NQAFDPERKGN	ENTLF CRLQV	300
HWAR1 .AMI	251	SLWAVLFLIG	RLVPLTVSVI	TVC GeflagsQ	NRNPDAITGN	VNVLA AAKLAV	300
RWAR1 .AMI	251	SLWPIVEISG	RLVPLTVSVI	TVGLHLAGT-	NRNGNAISGN	VNVIA AAKLAV	300
	310			320	330	340	350
HTRAM .AMI	301	IASICVTOAF	MMAKFBINFQI	RRI RREHSAFC	APAVKKKPFV	TK--GRSSKK	350
KIAA0057 .AMI	301	LLVCAAAQAM	LMMRFHSQL	RHWREYWN-E	OSAKRRVPAF	PRLPARLIR	350
HWAR1 .AMI	301	LSSSCTIQAY	VTMNLITLWL	QRWVEDSNIQ	ASCMKKR---	-R--SRSSKR	350
RWAR1 .AMI	301	LSSSCSCTQVY	ITMNLITLWL	QRWLEDANLH	V-CGRKR---	-R--SRS---	350
	360			370	380	390	400
HTRAM .AMI	351	GTEENGVMGTI	TSNVA DSPRN	KKEKSS	.....	.....	400
KIAA0057 .AMI	351	ESGYHEHGVV	KAENGTSPT	KKLKSP	.....	.....	400
HWAR1 .AMI	351	RTENGV-GVE	TSNRVDCPPK	RKEKSS	.....	.....	400
RWAR1 .AMI	351	RKGTE-NVE	NFNRIDSPPK	KKERKAP	.....	.....	400

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

7 / 15

☒ 3

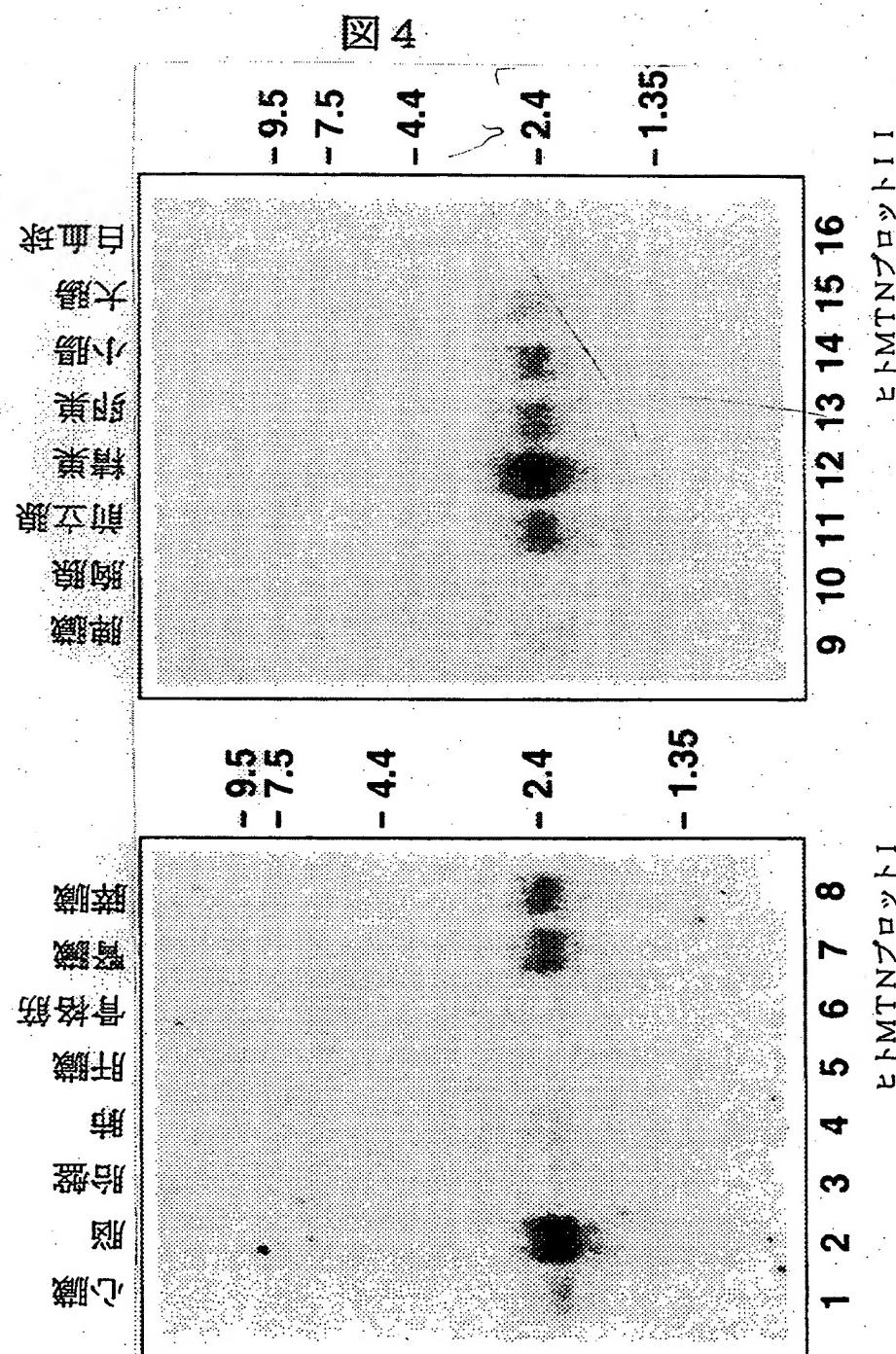


WAR-1

TRAM

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

8 / 15

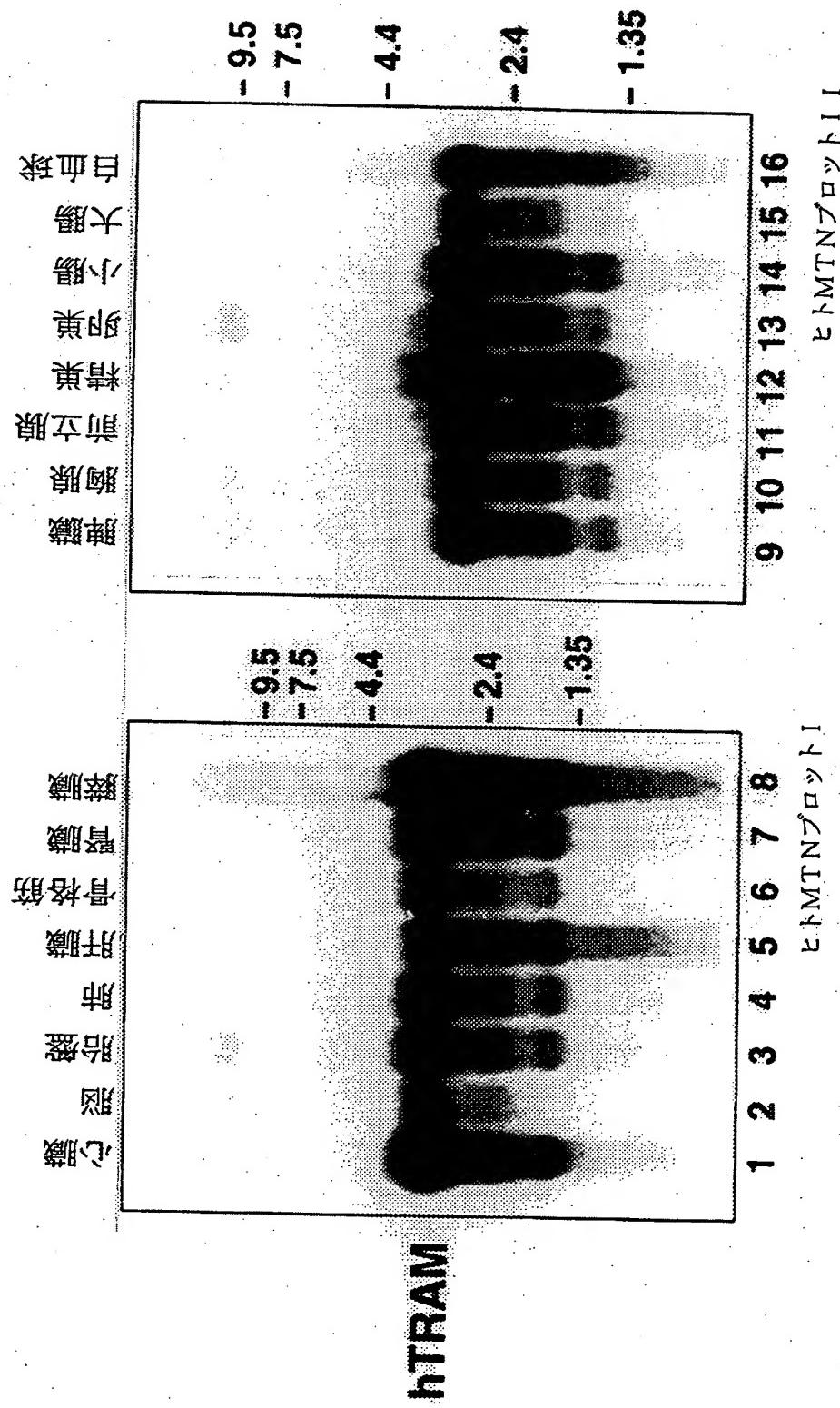


hWART

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

9/15

図 5

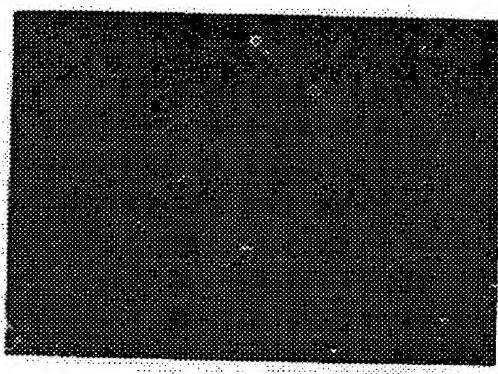


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

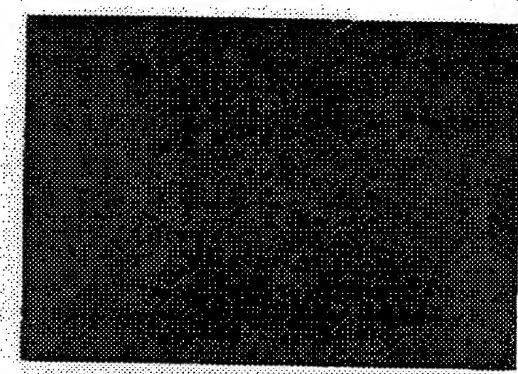
10 / 15

図 6

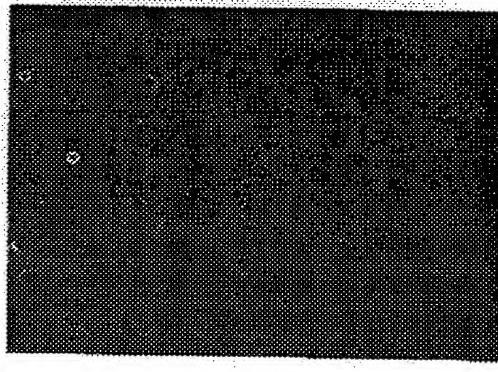
A



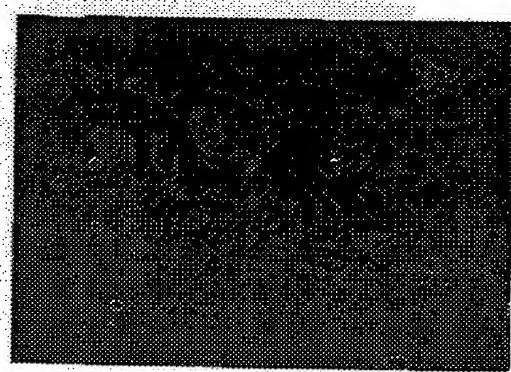
B



C



D

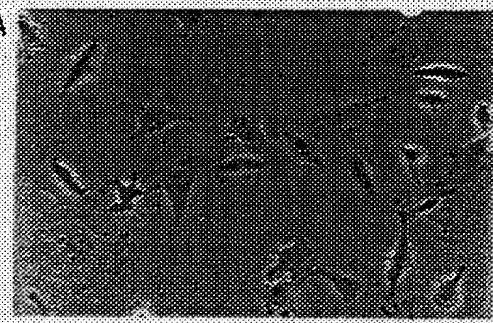


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

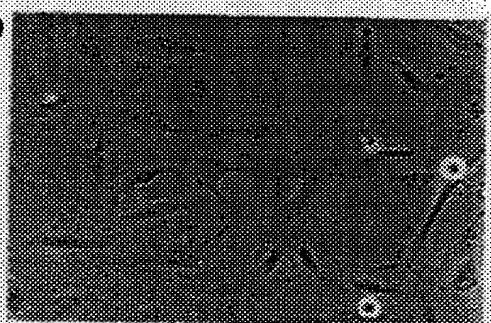
11 / 15

図 7

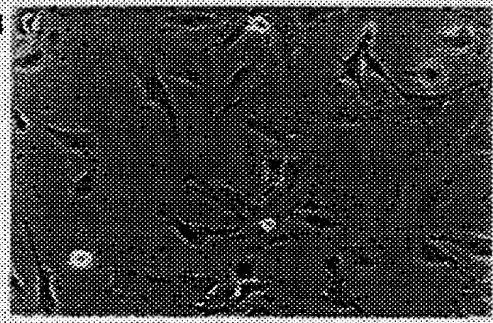
A



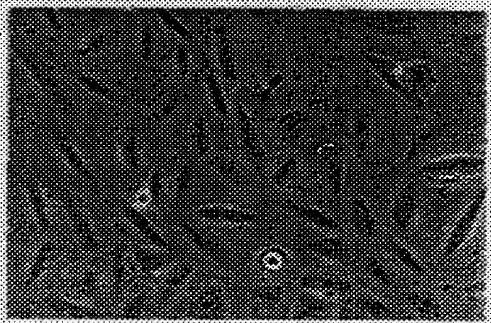
D



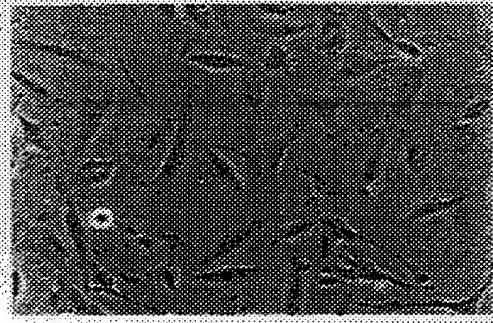
B



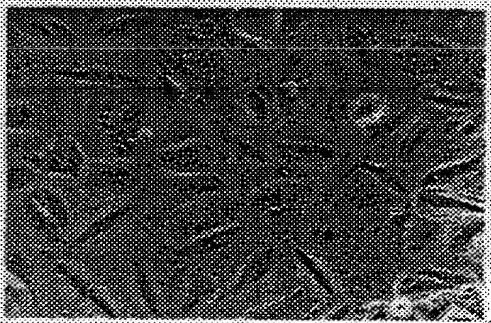
E



C



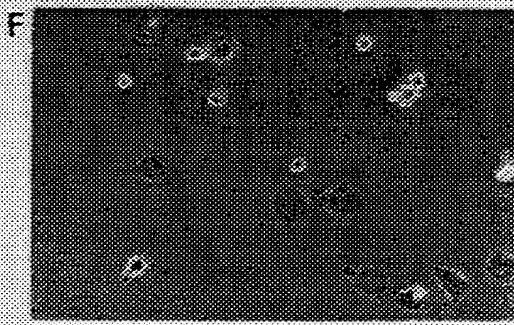
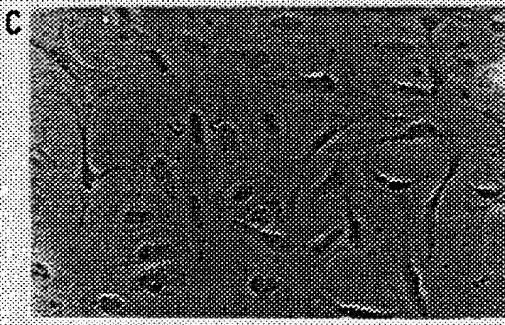
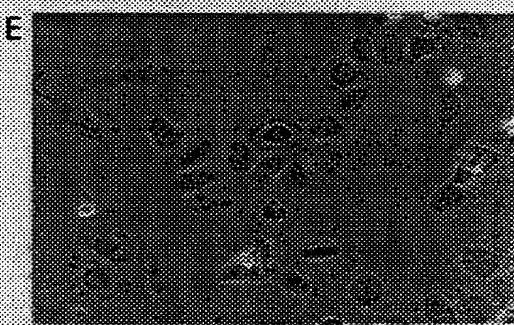
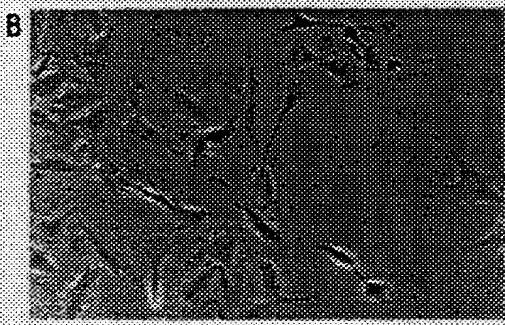
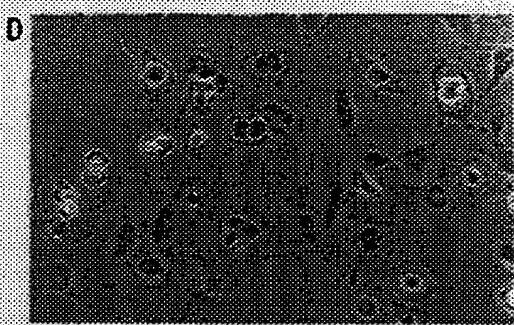
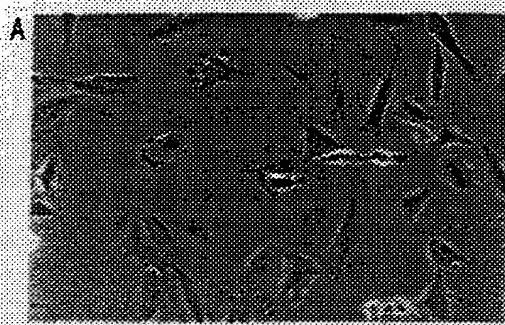
F



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

12 / 15

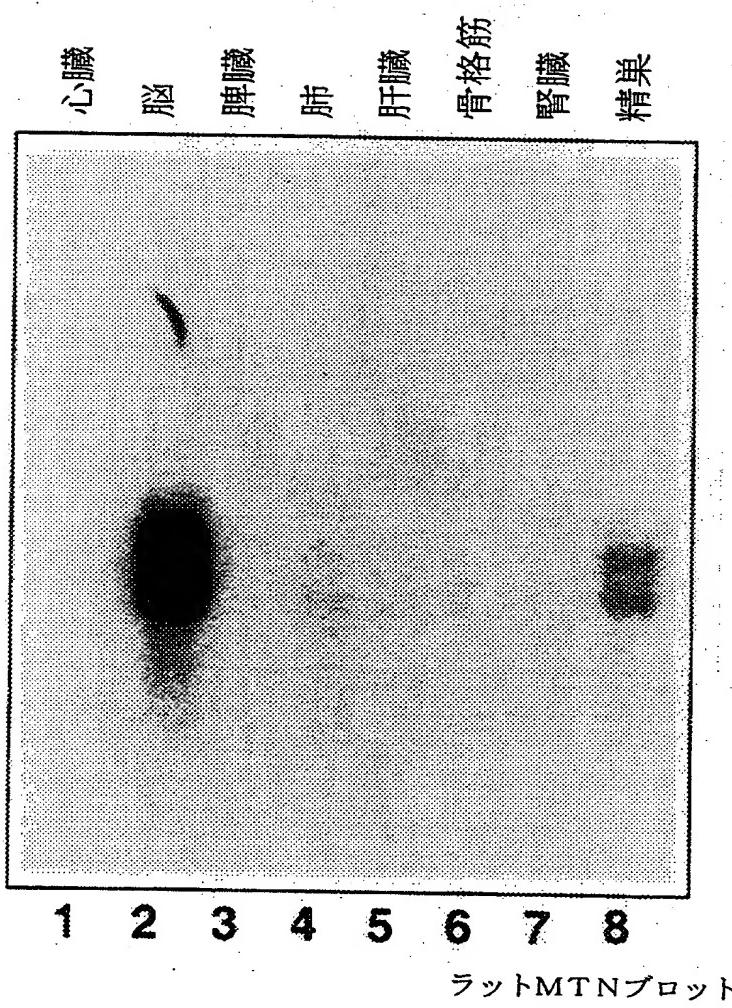
図 8



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

13 / 15

図 9

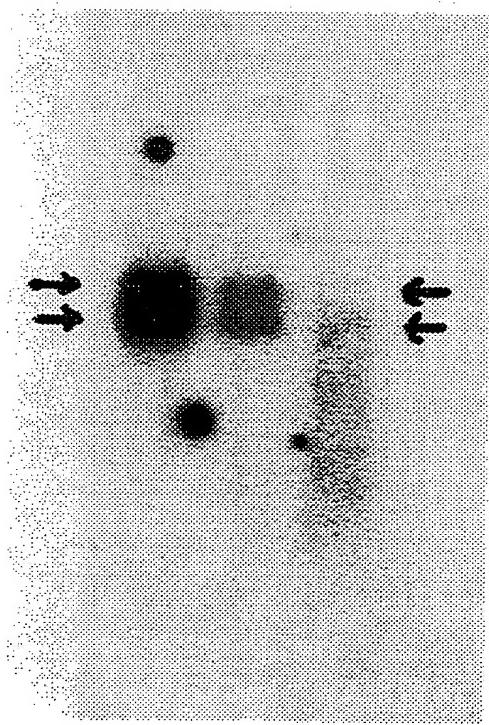


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

14/15

図10

1 2 3

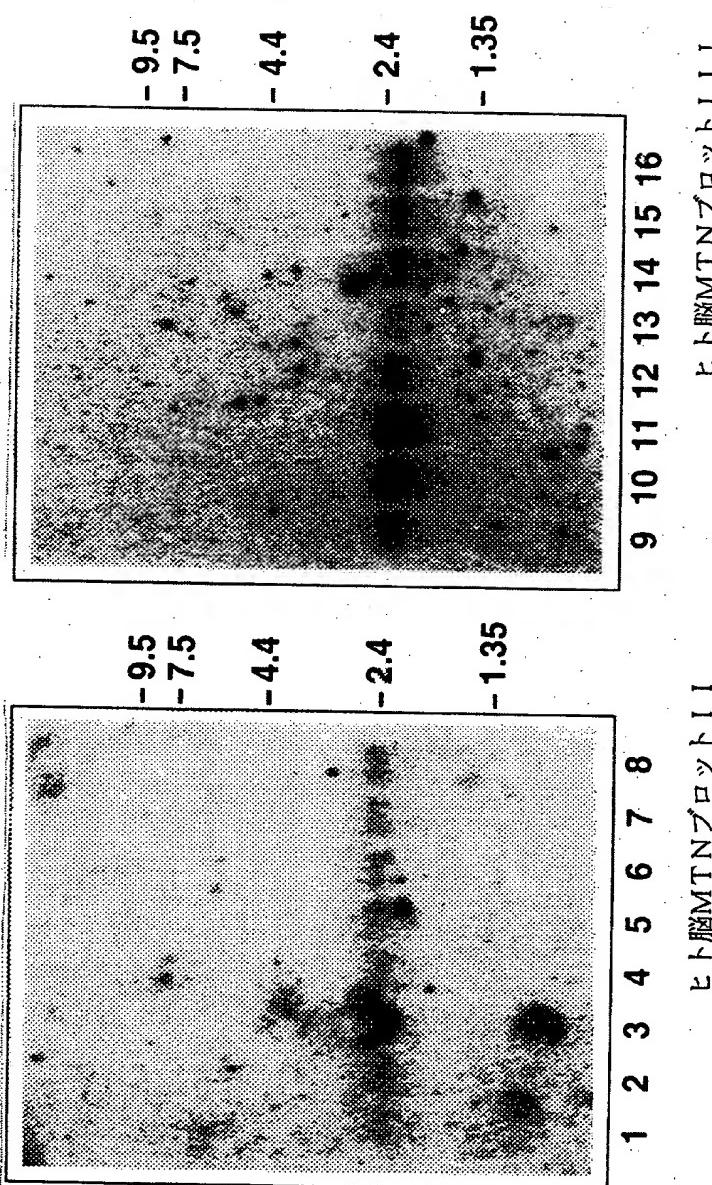


**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

15 / 15

図 1 1

視床  
視床下核  
黒質  
全脳  
海馬  
脳梁  
尾状核  
扁桃体



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

1/25

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Sumitomo Pharmaceuticals Company, Limited

&lt;120&gt; Novel protein WAR-1, and gene encoding the same

&lt;130&gt; 661562

5 &lt;150&gt; JP 10-290711

&lt;151&gt; 1998-10-13

&lt;160&gt; 13

&lt;210&gt; 1

10 &lt;211&gt; 2311

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 1

agagagagag agagagagag agagagagag agagagagaa atttgatttc cacagcatca 60

15 gtccttaag ggaagggtgag attcctaaga gatcagtaga gagcaccagg gagctcgctg 120

ctgtgttgc atgggtatga tggcaatggt aatgacagtgc accagatt tccctttcc 180

tgggaagccc ctccggctcc cgcgggtggg cggcggcggc gatcggtgcg gcaaatccgc 240

gctcgaccc gggcctgcgg ggcaggggcg cggcgctcga ttcccttccc tgcctctgca 300

gcccctgtgc gcatgctcgg cctacgcggc cccagcctt gattgatcgg tcggcagcgg 360

20 ctgcgaccct gggcggcaga cggcggggta tgggagcccc ggcgctggga gcggcgcagt 420

gatcagcggt ggccggccggt gagtaccggt gagtaccgcg gc atg ggg ctc cgc 474

Met Gly Leu Arg

aag aag aac gcc agg aac ccc ccg gtg ctg agc cac gaa ttc atg gtg 522

25 Lys Lys Asn Ala Arg Asn Pro Pro Val Leu Ser His Glu Phe Met Val

5 10 15 20

cag aac cac gcg gat atg gtc tcc tgc gtg ggc atg ttc ttc gtg ctg 570

Gln Asn His Ala Asp Met Val Ser Cys Val Gly Met Phe Phe Val Leu

25

30

35

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2/25

	gga ctt atg ttc gag ggc acg gcc gag atg tcg atc gtg ttc ctc acc	618		
	Gly Leu Met Phe Glu Gly Thr Ala Glu Met Ser Ile Val Phe Leu Thr			
	40	45	50	
	ctg cag cat gga gtc gtt gtc cca gcg gaa ggg cta ccc tcg ggg tcc	666		
5	Leu Gln His Gly Val Val Val Pro Ala Glu Gly Leu Pro Ser Gly Ser			
	55	60	65	
	agg acc ctt tac cat tat ggg gtc aaa gat ctg gcc aca gtg ttc ttc	714		
	Arg Thr Leu Tyr His Tyr Gly Val Lys Asp Leu Ala Thr Val Phe Phe			
	70	75	80	
10	tac atg ctg gtg gcc atc atc att cac gcc acc att cag gag tac gtg	762		
	Tyr Met Leu Val Ala Ile Ile Ile His Ala Thr Ile Gln Glu Tyr Val			
	85	90	95	100
	cta gat aag ctc agc cgg aga ctg cag ctc acc aaa ggc aaa caa aac	810		
	Leu Asp Lys Leu Ser Arg Arg Leu Gln Leu Thr Lys Gly Lys Gln Asn			
15	105	110	115	
	aaa ttg aat gag gcc ggg cag ctg agt gtg ttc tac ata gtg tct ggt	858		
	Lys Leu Asn Glu Ala Gly Gln Leu Ser Val Phe Tyr Ile Val Ser Gly			
	120	125	130	
	atc tgg ggt atg atc att ctg gcc tct gag aac tgc ctg tca gac ccc	906		
20	Ile Trp Gly Met Ile Ile Leu Ala Ser Glu Asn Cys Leu Ser Asp Pro			
	135	140	145	
	act cta ttg tgg aag tct cag ccc cac aac atg atg aca ttt cag atg	954		
	Thr Leu Leu Trp Lys Ser Gln Pro His Asn Met Met Thr Phe Gln Met			
	150	155	160	
25	aaa ttt ttc tac atc tca cag ttg gct tac tgg ttt cat agt ttc ccg	1002		
	Lys Phe Phe Tyr Ile Ser Gln Leu Ala Tyr Trp Phe His Ser Phe Pro			
	165	170	175	180
	gag ctc tac ttc cag aaa gtc agg aaa caa gat atc ccg ggt caa ctc	1050		
	Glu Leu Tyr Phe Gln Lys Val Arg Lys Gln Asp Ile Pro Gly Gln Leu			

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3/25

	185	190	195	
	atc tac att ggc ctc cac ctc ttc cac att gga ggg gcc tat ctc ttg			1098
	Ile Tyr Ile Gly Leu His Leu Phe His Ile Gly Gly Ala Tyr Leu Leu			
	200	205	210	
5	tac ttg aac cac ctg ggc ctg ctg ctt ctg atg ctg cac tat gct gtc			1146
	Tyr Leu Asn His Leu Gly Leu Leu Leu Met Leu His Tyr Ala Val			
	215	220	225	
	gag ctc ctc tcc agc gtg tgc agc ctg ctt tac ttt ggg gat gag cgg			1194
	Glu Leu Leu Ser Ser Val Cys Ser Leu Leu Tyr Phe Gly Asp Glu Arg			
10	230	235	240	
	tac cag aaa ggg ttg tct ttg tgg cct atc gtg ttt ata tcc ggg aga			1242
	Tyr Gln Lys Gly Leu Ser Leu Trp Pro Ile Val Phe Ile Ser Gly Arg			
	245	250	255	260
	ctc gtg aca ctg att gtc tca gtg gtt aca gta ggg ctt cac ttg gcc			1290
15	Leu Val Thr Leu Ile Val Ser Val Val Thr Val Gly Leu His Leu Ala			
	265	270	275	
	ggg aca aat cg aat gga aat gct ctc tct ggt aat gtc aat gtg ttg			1338
	Gly Thr Asn Arg Asn Gly Asn Ala Leu Ser Gly Asn Val Asn Val Leu			
	280	285	290	
20	gca gct aaa atc gct gtt ctg tcc tcg agt tgc agt atc cag gtg tac			1386
	Ala Ala Lys Ile Ala Val Leu Ser Ser Ser Cys Ser Ile Gln Val Tyr			
	295	300	305	
	ata aca tgg acc ttg acg acc gtc tgg ctt cag aga tgg tta gaa gat			1434
	Ile Thr Trp Thr Leu Thr Thr Val Trp Leu Gln Arg Trp Leu Glu Asp			
25	310	315	320	
	gcg aat ctt cat gtc tgt ggg agg aag aga cgg tcc agg tcg aga aaa			1482
	Ala Asn Leu His Val Cys Gly Arg Lys Arg Arg Ser Arg Ser Arg Lys			
	325	330	335	340
	ggc aca gaa aat gga gtg gag aat cca aat aga ata gat tct cca cca			1530

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4/25

Gly Thr Glu Asn Gly Val Glu Asn Pro Asn Arg Ile Asp Ser Pro Pro

345

350

355

aag aag aaa gag aaa gct cct tagcagttgc aagcgaattt attcttacct 1581

Lys Lys Lys Glu Lys Ala Pro

5 360  
ccaaggaaat ccacttcc tc tatgtggtg tctctgtgct agagatttc tgttcttcag 1641

aacgggtcggt gcttttgaa tattgcta atgtgtctta atgtgtttt aaggtttgc 1701

agacgtatga gtggggatg ggggttaaga ctaaaccact cagcctctaa atacagtcag 1761

aatagttaac ggaccaacat ctatattgt taggttctta cctcaacgat ttccaaacg 1821

10 ttttgtggtg atgactgcag aattgtgtac ataaataata gttcctgct tccaatgttc 1881

tttatacgaa taacaagtct gctagcaaag tggtttgc tctcaatgtt ctcctgcagg 1941

ataaaatggaa aaatctgata aaggtaaac tcaaattcgtt attatgttaac cgttgggatt 2001

tttttaaagt gtttaaatt tacaatggaa agcatttgc aaaccaccaa aaatatgtgt 2061

ttaattttat gagtagtaat tgtagtgct tacgccccca taaaagcatc aaaatatgaa 2121

15 tagatgacat gtgtggtgat attgacattt agcgaatcaa gatacctta ataaatatgg 2181

tgggttacta aagaagtaaa cgacttcc tcgtttattt taaacacttg tacaggaaaa 2241

ctcgcaaaat taaatattac tgaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa 2301

aaaaaaaaaaaa 2311

20 <210> 2

<211> 363

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 2

25 Met Gly Leu Arg Lys Lys Asn Ala Arg Asn Pro Pro Val Leu Ser His

5

10

15

Glu Phe Met Val Gln Asn His Ala Asp Met Val Ser Cys Val Gly Met

20

25

30

Phe Phe Val Leu Gly Leu Met Phe Glu Gly Thr Ala Glu Met Ser Ile

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

5/25

35

40

45

Val Phe Leu Thr Leu Gln His Gly Val Val Val Pro Ala Glu Gly Leu

50

55

60

Pro Ser Gly Ser Arg Thr Leu Tyr His Tyr Gly Val Lys Asp Leu Ala

5

65 70 75 80

Thr Val Phe Phe Tyr Met Leu Val Ala Ile Ile Ile His Ala Thr Ile

85

90

95

Gln Glu Tyr Val Leu Asp Lys Leu Ser Arg Arg Leu Gln Leu Thr Lys

100

105

110

10 Gly Lys Gln Asn Lys Leu Asn Glu Ala Gly Gln Leu Ser Val Phe Tyr

115

120

125

Ile Val Ser Gly Ile Trp Gly Met Ile Ile Leu Ala Ser Glu Asn Cys

130

135

140

Leu Ser Asp Pro Thr Leu Leu Trp Lys Ser Gln Pro His Asn Met Met

15

145 150 155 160

Thr Phe Gln Met Lys Phe Phe Tyr Ile Ser Gln Leu Ala Tyr Trp Phe

165

170

175

His Ser Phe Pro Glu Leu Tyr Phe Gln Lys Val Arg Lys Gln Asp Ile

180

185

190

20

Pro Gly Gln Leu Ile Tyr Ile Gly Leu His Leu Phe His Ile Gly Gly

195

200

205

Ala Tyr Leu Leu Tyr Leu Asn His Leu Gly Leu Leu Leu Met Leu

210

215

220

His Tyr Ala Val Glu Leu Leu Ser Ser Val Cys Ser Leu Leu Tyr Phe

25

225 230 235 240

Gly Asp Glu Arg Tyr Gln Lys Gly Leu Ser Leu Trp Pro Ile Val Phe

245

250

255

Ile Ser Gly Arg Leu Val Thr Leu Ile Val Ser Val Val Thr Val Gly

260

265

270

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

6/25

Leu His Leu Ala Gly Thr Asn Arg Asn Gly Asn Ala Leu Ser Gly Asn

275

280

285

Val Asn Val Leu Ala Ala Lys Ile Ala Val Leu Ser Ser Ser Cys Ser

290

295

300

5 Ile Gln Val Tyr Ile Thr Trp Thr Leu Thr Thr Val Trp Leu Gln Arg

305 Trp Leu Glu Asp Ala Asn Leu His Val Cys Gly Arg Lys Arg Arg Ser

325

330

335

Arg Ser Arg Lys Gly Thr Glu Asn Gly Val Glu Asn Pro Asn Arg Ile

10

340

345

350

Asp Ser Pro Pro Lys Lys Glu Lys Ala Pro

355

360

<210> 3

15

<211> 2288

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

tatagggcac gcgtggtcga cggccgggc tggtaactggg attttgctgt tattattatg 60

20 ctatttgttgt tataattaat gatctgaaga ataaccagag ctctataggt ttatcatgat 120

tactaatgaa gatgccacta aaaaaaagaa ttcaaggagca tcttggcggt ggcagcgggt 180

ttgaagatgc gacgatcaac gttgaagatc accgctcgca accccgggcc tggcgccggg 240

tagggcgcg ggcgctcgatt tccttcctg cctccgcccgt cccctgggt cgcatgctca 300

gctcagctcg gccctcgccct ttgatttatt tttttctgg gcggccgctg cgacccggga 360

25 ctgacttcgg gatgggaagt ggagcccccg gagctgctac cgtggcgccg ggcgtgtgag 420

gagcagccag ggggaggcag ctgcggctcg ccggtgagta tccggaaagc gccacc 476

atg ggg ctc cgt aag aag agc acc aag aac ccc ccc gtt ctc agc cag 524

Met Gly Leu Arg Lys Lys Ser Thr Lys Asn Pro Pro Val Leu Ser Gln

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

7/25

	gaa ttc atc ctg cag aat cat gcg gac atc gtc tcc tgc gtg ggg atg	572
	Glu Phe Ile Leu Gln Asn His Ala Asp Ile Val Ser Cys Val Gly Met	
	20 25 30	
	ttc ttc ctg ctg ggg ctt gtg ttc gag gga aca gca gaa gca tcc atc	620
5	Phe Phe Leu Leu Gly Leu Val Phe Glu Gly Thr Ala Glu Ala Ser Ile	
	35 40 45	
	gtg ttt ctc act ctt cag cac agt gtt gct gtc cct gca gca gag gaa	668
	Val Phe Leu Thr Leu Gln His Ser Val Ala Val Pro Ala Ala Glu Glu	
	50 55 60	
10	caa gcc acg ggc tca aag tcc ctc tat tat tat ggt gtc aaa gat ttg	716
	Gln Ala Thr Gly Ser Lys Ser Leu Tyr Tyr Gly Val Lys Asp Leu	
	65 70 75 80	
	gcc acg gtt ttc ttc tac atg ctg gtg gca atc att att cat gcc aca	764
	Ala Thr Val Phe Phe Tyr Met Leu Val Ala Ile Ile Ile His Ala Thr	
15	85 90 95	
	att cag gaa tat gtg ttg gat aaa att aac aag aga atg cag ttc acc	812
	Ile Gln Glu Tyr Val Leu Asp Lys Ile Asn Lys Arg Met Gln Phe Thr	
	100 105 110	
	aaa gcg aaa caa aac aag ttt aac gag tct ggt cag ttt agt gtg ttc	860
20	Lys Ala Lys Gln Asn Lys Phe Asn Glu Ser Gly Gln Phe Ser Val Phe	
	115 120 125	
	tac ttt ttt tct tgt att tgg ggc aca ttc att tta atc tct gaa aac	908
	Tyr Phe Phe Ser Cys Ile Trp Gly Thr Phe Ile Leu Ile Ser Glu Asn	
	130 135 140	
25	tgc ctg tca gac cca act ctt ata tgg aag gct cgt ccc cat agc atg	956
	Cys Leu Ser Asp Pro Thr Leu Ile Trp Lys Ala Arg Pro His Ser Met	
	145 150 155 160	
	atg aca ttt caa atg aag ttt ttc tac ata tcc cag ttg gct tac tgg	1004
	Met Thr Phe Gln Met Lys Phe Phe Tyr Ile Ser Gln Leu Ala Tyr Trp	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

8/25

	165	170	175	
	ttt cat gct ttt cct gaa ctc tac ttc cag aaa acc aaa caa gac			1052
	Phe His Ala Phe Pro Glu Leu Tyr Phe Gln Lys Thr Lys Gln Asp			
	180	185	190	
5	atc cct cgt caa ctt gtc tac att ggt ctt cac ctc ttc cac att act			1100
	Ile Pro Arg Gln Leu Val Tyr Ile Gly Leu His Leu Phe His Ile Thr			
	195	200	205	
	gga gct tat ctc ttg tac ttg aat cat ttg gga ctt ctt ctt ttg gta			1148
	Gly Ala Tyr Leu Leu Tyr Leu Asn His Leu Gly Leu Leu Leu Val			
10	210	215	220	
	ctg cat tat ttt gtt gaa tta ctt tcc cac atg tgc ggc ctg ttt tac			1196
	Leu His Tyr Phe Val Glu Leu Leu Ser His Met Cys Gly Leu Phe Tyr			
	225	230	235	240
	ttt agt gat gaa aag tac cag aaa ggc ata tct ctg tgg gcc att gtg			1244
15	Phe Ser Asp Glu Lys Tyr Gln Lys Gly Ile Ser Leu Trp Ala Ile Val			
	245	250	255	
	ttt atc ttg ggt aga ctt gtg act tta att gtt tcc gta ctc act gtt			1292
	Phe Ile Leu Gly Arg Leu Val Thr Leu Ile Val Ser Val Leu Thr Val			
	260	265	270	
20	ggg ttt cac ctg gct gga tcg cag aat cgg aat cct gat gcc ctt act			1340
	Gly Phe His Leu Ala Gly Ser Gln Asn Arg Asn Pro Asp Ala Leu Thr			
	275	280	285	
	gga aat gta aat gtg ttg gca gct aaa att gct gtt ctg tcg tcc agt			1388
	Gly Asn Val Asn Val Leu Ala Ala Lys Ile Ala Val Leu Ser Ser Ser			
25	290	295	300	
	tgc acg atc caa gcc tac gta aca tgg aac tta att act ctc tgg ctt			1436
	Cys Thr Ile Gln Ala Tyr Val Thr Trp Asn Leu Ile Thr Leu Trp Leu			
	305	310	315	320
	cag agg tgg gta gaa gat tct aat att cag gcc tca tgt atg aaa aag			1484

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

9/25

	Gln Arg Trp Val Glu Asp Ser Asn Ile Gln Ala Ser Cys Met Lys Lys		
	325	330	335
	aaa cgg tcg aga tct tct aaa aaa aga aca gaa aac gga gtg gga gtg		1532
	Lys Arg Ser Arg Ser Ser Lys Lys Arg Thr Glu Asn Gly Val Gly Val		
5	340	345	350
	gaa act tca aat aga gta gac tgt ccg cca aag agg aaa gag aaa tct		1580
	Glu Thr Ser Asn Arg Val Asp Cys Pro Pro Lys Arg Lys Glu Lys Ser		
	355	360	365
	tca taatcttgc aagcgcattg attaatgtct gcaaaggaat ctgctcttg		1633
10	Ser		
	aggtttcttt ctgcactaga gatTTTctg ttttgaaaa tagttcgtgc tcttcggttt		1693
	ttgttattga actgtttcat gtatTTTta aagacatttggggaggag gattattatg		1753
	aatggggaaaa aaagatTTG gttgagacta aattactcat cgtcaaaata atgtcaaaat		1813
15	agttttgggg atcaccacta tatTTTgtt tgatTTTaa ctttcaaca tttcctaatt		1873
	gatttgcaga gataactgca caatTTgca tatcaatgtat actggTTctt actcccacca		1933
	gtgtttcata atactaacaa gatggTctct cctagcaaga ttatgtgtt aatgcttgct		1993
	ttggggtaaa ataaaagtac gaaaaagggtg gaagtcaaat cagtattctg taattgttag		2053
	aatttatttt ttaagaactt acaactcaga aaagattgct agactcacca aaataataaa		2113
20	tgttctttat ttacaggta gtgattatta gtgcttcatc cccatttaaa aaaacacagt		2173
	actaatgggt aacacatatg gaggtttgct gccatatata ttgcatcaaa atatcattaa		2233
	ttaatataaa aatattaaaa tcattcctgt ccattccact tgtaaatggg aattc		2288
	<210> 4		
25	<211> 369		
	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 4		
	Met Gly Leu Arg Lys Lys Ser Thr Lys Asn Pro Pro Val Leu Ser Gln		

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

10/25

	5	10	15
	Glu Phe Ile Leu Gln Asn His Ala Asp Ile Val Ser Cys Val Gly Met		
	20	25	30
	Phe Phe Leu Leu Gly Leu Val Phe Glu Gly Thr Ala Glu Ala Ser Ile		
5	35	40	45
	Val Phe Leu Thr Leu Gln His Ser Val Ala Val Pro Ala Ala Glu Glu		
	50	55	60
	Gln Ala Thr Gly Ser Lys Ser Leu Tyr Tyr Tyr Gly Val Lys Asp Leu		
	65	70	75
10	Ala Thr Val Phe Phe Tyr Met Leu Val Ala Ile Ile Ile His Ala Thr		80
	85	90	95
	Ile Gln Glu Tyr Val Leu Asp Lys Ile Asn Lys Arg Met Gln Phe Thr		
	100	105	110
	Lys Ala Lys Gln Asn Lys Phe Asn Glu Ser Gly Gln Phe Ser Val Phe		
15	115	120	125
	Tyr Phe Phe Ser Cys Ile Trp Gly Thr Phe Ile Leu Ile Ser Glu Asn		
	130	135	140
	Cys Leu Ser Asp Pro Thr Leu Ile Trp Lys Ala Arg Pro His Ser Met		
	145	150	155
20	Met Thr Phe Gln Met Lys Phe Phe Tyr Ile Ser Gln Leu Ala Tyr Trp		160
	165	170	175
	Phe His Ala Phe Pro Glu Leu Tyr Phe Gln Lys Thr Lys Gln Asp		
	180	185	190
	Ile Pro Arg Gln Leu Val Tyr Ile Gly Leu His Leu Phe His Ile Thr		
25	195	200	205
	Gly Ala Tyr Leu Leu Tyr Leu Asn His Leu Gly Leu Leu Leu Val		
	210	215	220
	Leu His Tyr Phe Val Glu Leu Leu Ser His Met Cys Gly Leu Phe Tyr		
	225	230	235
			240

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

11/25

Phe Ser Asp Glu Lys Tyr Gln Lys Gly Ile Ser Leu Trp Ala Ile Val

245	250	255
-----	-----	-----

Phe Ile Leu Gly Arg Leu Val Thr Leu Ile Val Ser Val Leu Thr Val

260	265	270
-----	-----	-----

5 Gly Phe His Leu Ala Gly Ser Gln Asn Arg Asn Pro Asp Ala Leu Thr

275	280	285
-----	-----	-----

Gly Asn Val Asn Val Leu Ala Ala Lys Ile Ala Val Leu Ser Ser Ser

290	295	300
-----	-----	-----

Cys Thr Ile Gln Ala Tyr Val Thr Trp Asn Leu Ile Thr Leu Trp Leu

10 305 310 315 320

Gln Arg Trp Val Glu Asp Ser Asn Ile Gln Ala Ser Cys Met Lys Lys

325	330	335
-----	-----	-----

Lys Arg Ser Arg Ser Ser Lys Lys Arg Thr Glu Asn Gly Val Gly Val

340	345	350
-----	-----	-----

15 Glu Thr Ser Asn Arg Val Asp Cys Pro Pro Lys Arg Lys Glu Lys Ser

355	360	365
-----	-----	-----

Ser

20 <210> 5

<211> 1267

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

25 cagcgagcgg ctgcagcggg gccgtgacca gcagccagcg ggaggcggcg gcgagtcggt 60

gagcagctgg gaagagcaga accggggcgg agcacctgca ggcgcggcgc gcgccccac 120

c atg gcg att cgc aag aaa agc acc aag agc ccc cca gtg ctg agc 166

Met Ala Ile Arg Lys Lys Ser Thr Lys Ser Pro Pro Val Leu Ser

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

12/25

	cac gaa ttc gtc ctg cag aat cac gcg gac atc gtc tcc tgt gtg gcg	214
	His Glu Phe Val Leu Gln Asn His Ala Asp Ile Val Ser Cys Val Ala	
	20 25 30	
	atg gtc ttc ctg ctg ggg ctc atg ttt gag ata acg gca aaa gct tct	262
5	Met Val Phe Leu Leu Gly Leu Met Phe Glu Ile Thr Ala Lys Ala Ser	
	35 40 45	
	atc att ttt gtt act ctt cag tac aat gtc acc ctc cca gca aca gaa	310
	Ile Ile Phe Val Thr Leu Gln Tyr Asn Val Thr Leu Pro Ala Thr Glu	
	50 55 60	
10	gaa caa gct act gaa tca gtg tcc ctt tat tac tat ggc atc aaa gat	358
	Glu Gln Ala Thr Glu Ser Val Ser Leu Tyr Tyr Gly Ile Lys Asp	
	65 70 75	
	ttg gct act gtt ttc ttc tac atg cta gtg gcg ata att att cat gcc	406
	Leu Ala Thr Val Phe Phe Tyr Met Leu Val Ala Ile Ile Ile His Ala	
15	80 85 90 95	
	gta att caa gag tat atg ttg gat aaa att aac agg cga atg cac ttc	454
	Val Ile Gln Glu Tyr Met Leu Asp Lys Ile Asn Arg Arg Met His Phe	
	100 105 110	
	tcc aaa aca aaa cac agc aag ttt aat gaa tct ggt cag ctt agt gcg	502
20	Ser Lys Thr Lys His Ser Lys Phe Asn Glu Ser Gly Gln Leu Ser Ala	
	115 120 125	
	ttc tac ctt ttt gcc tgt gtt tgg ggc aca ttc att ctc atc tct gaa	550
	Phe Tyr Leu Phe Ala Cys Val Trp Gly Thr Phe Ile Leu Ile Ser Glu	
	130 135 140	
25	aac tac atc tca gac cca act atc tta tgg agg gct tat ccc cat aac	598
	Asn Tyr Ile Ser Asp Pro Thr Ile Leu Trp Arg Ala Tyr Pro His Asn	
	145 150 155	
	ctg atg aca ttt caa atg aag ttt ttc tac ata tca cag ctg gct tac	646
	Leu Met Thr Phe Gln Met Lys Phe Phe Tyr Ile Ser Gln Leu Ala Tyr	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

13/25

160	165	170	175
tgg ctt cat gct ttt cct gaa ctc tac ttc cag aaa acc aaa aaa gaa			
Trp Leu His Ala Phe Pro Glu Leu Tyr Phe Gln Lys Thr Lys Lys Glu			
5	180	185	190
gat att cct cgt cag ctt gtc tac att ggt ctt tac ctc ttc cac att			
Asp Ile Pro Arg Gln Leu Val Tyr Ile Gly Leu Tyr Leu Phe His Ile			
10	195	200	205
gct gga gct tac ctt ttg aac ttg aat cat cta gga ctt gtt ctt ctg			
Ala Gly Ala Tyr Leu Leu Asn Leu Asn His Leu Gly Leu Val Leu Leu			
15	210	215	220
gtg cta cat tat ttt gtt gaa ttt ctt ttc cac att tcc cgc ctg ttt			
Val Leu His Tyr Phe Val Glu Phe Leu Phe His Ile Ser Arg Leu Phe			
20	225	230	235
tat ttt agc aat gaa aag tat cag aaa gga ttt tct ctg tgg gca gtt			
Tyr Phe Ser Asn Glu Lys Tyr Gln Lys Gly Phe Ser Leu Trp Ala Val			
25	240	245	250
ctt ttt gtt ttg gga aga ctt ctg act tta att ctt tca gta ctg act			
Leu Phe Val Leu Gly Arg Leu Leu Thr Leu Ile Leu Ser Val Leu Thr			
30	260	265	270
gtt ggt ttt ggc ctt gca aga gca gaa aat cag aaa ctg gat ttc agt			
Val Gly Phe Gly Leu Ala Arg Ala Glu Asn Gln Lys Leu Asp Phe Ser			
35	275	280	285
act gga aac ttc aat gtg tta gct gtt aga atc gct gtt ctg gca tcc			
Thr Gly Asn Phe Asn Val Leu Ala Val Arg Ile Ala Val Leu Ala Ser			
40	290	295	300
att tgc gtt act cag gca ttt atg atg tgg aag ttc att aat ttt cag			
Ile Cys Val Thr Gln Ala Phe Met Met Trp Lys Phe Ile Asn Phe Gln			
45	305	310	315
ctt cga agg tgg agg gaa cat tct gct ttt cag gca cca gct gtg aag			
			1126

**THIS PAGE BLANK (USPTO).**

14/25

	Leu Arg Arg Trp Arg Glu His Ser Ala Phe Gln Ala Pro Ala Val Lys		
320	325	330	335
	aag aaa cca aca gta act aaa ggc aga tct tct aaa aaa gga aca gaa		1174
	Lys Lys Pro Thr Val Thr Lys Gly Arg Ser Ser Lys Lys Gly Thr Glu		
5	340	345	350
	aat ggt gtg aat gga aca tta act tca aat gta gca gac tct ccc cgg		1222
	Asn Gly Val Asn Gly Thr Leu Thr Ser Asn Val Ala Asp Ser Pro Arg		
	355	360	365
	aat aaa aaa gag aaa tct tca taatgaatta taaaactaatt gatt		1267
10	Asn Lys Lys Glu Lys Ser Ser		
	370		
	<210> 6		
	<211> 374		
15	<212> PRT		
	<213> Homo sapiens		
	<400> 6		
	Met Ala Ile Arg Lys Lys Ser Thr Lys Ser Pro Pro Val Leu Ser His		
	5	10	15
20	Glu Phe Val Leu Gln Asn His Ala Asp Ile Val Ser Cys Val Ala Met		
	20	25	30
	Val Phe Leu Leu Gly Leu Met Phe Glu Ile Thr Ala Lys Ala Ser Ile		
	35	40	45
	Ile Phe Val Thr Leu Gln Tyr Asn Val Thr Leu Pro Ala Thr Glu Glu		
25	50	55	60
	Gln Ala Thr Glu Ser Val Ser Leu Tyr Tyr Tyr Gly Ile Lys Asp Leu		
	65	70	75
	Ala Thr Val Phe Phe Tyr Met Leu Val Ala Ile Ile Ile His Ala Val		
	85	90	95

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

15/25

Ile Gln Glu Tyr Met Leu Asp Lys Ile Asn Arg Arg Met His Phe Ser  
100 105 110  
Lys Thr Lys His Ser Lys Phe Asn Glu Ser Gly Gln Leu Ser Ala Phe  
115 120 125  
5 Tyr Leu Phe Ala Cys Val Trp Gly Thr Phe Ile Leu Ile Ser Glu Asn  
130 135 140  
Tyr Ile Ser Asp Pro Thr Ile Leu Trp Arg Ala Tyr Pro His Asn Leu  
145 150 155 160  
Met Thr Phe Gln Met Lys Phe Phe Tyr Ile Ser Gln Leu Ala Tyr Trp  
10 165 170 175  
Leu His Ala Phe Pro Glu Leu Tyr Phe Gln Lys Thr Lys Glu Asp  
180 185 190  
Ile Pro Arg Gln Leu Val Tyr Ile Gly Leu Tyr Leu Phe His Ile Ala  
195 200 205  
15 Gly Ala Tyr Leu Leu Asn Leu Asn His Leu Gly Leu Val Leu Val  
210 215 220  
Leu His Tyr Phe Val Glu Phe Leu Phe His Ile Ser Arg Leu Phe Tyr  
225 230 235 240  
Phe Ser Asn Glu Lys Tyr Gln Lys Gly Phe Ser Leu Trp Ala Val Leu  
20 245 250 255  
Phe Val Leu Gly Arg Leu Leu Thr Leu Ile Leu Ser Val Leu Thr Val  
260 265 270  
Gly Phe Gly Leu Ala Arg Ala Glu Asn Gln Lys Leu Asp Phe Ser Thr  
275 280 285  
25 Gly Asn Phe Asn Val Leu Ala Val Arg Ile Ala Val Leu Ala Ser Ile  
290 295 300  
Cys Val Thr Gln Ala Phe Met Met Trp Lys Phe Ile Asn Phe Gln Leu  
305 310 315 320  
Arg Arg Trp Arg Glu His Ser Ala Phe Gln Ala Pro Ala Val Lys Lys

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

16/25

325

330

335

Lys Pro Thr Val Thr Lys Gly Arg Ser Ser Lys Lys Gly Thr Glu Asn

340

345

350

Gly Val Asn Gly Thr Leu Thr Ser Asn Val Ala Asp Ser Pro Arg Asn

5

355

360

365

Lys Lys Glu Lys Ser Ser

370

&lt;210&gt; 7

10

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 7

cacctggctg gatcgagaa tcgg

24

15

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

20

&lt;400&gt; 8

ctctttcctc ttggcggac agtc

24

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 24

25

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 9

ggccttgcaa gagcagaaaa tcag

24

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

17/25

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

5 &lt;400&gt; 10

tttattccgg ggagagtctg ctac

24

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 49

10 &lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Rattus norvegicus

&lt;400&gt; 11

attttctgtg cctttctcg acctggaccg tcttttcctc ccacagaca

49

15 &lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 6974

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 12

20 cggtgctgga gaagtttgcg ctgcggttcg tgagcgcagg gtgcgggccc cgccggccgc 60

tgcgcccccg ctgcc atg gct ttc cgc agg agg acg aaa agt tac ccg ctc 111

Met Ala Phe Arg Arg Arg Thr Lys Ser Tyr Pro Leu

5 10

ttc agc cag gag ttc gtc atc cac aac cat gcg gac atc ggc ttc tgc 159

25 Phe Ser Gln Glu Phe Val Ile His Asn His Ala Asp Ile Gly Phe Cys

15 20 25

ctg gtg ctc tgc gtc ctc atc ggg ctt atg ttc gag gtc aca gcc aag 207

Leu Val Leu Cys Val Leu Ile Gly Leu Met Phe Glu Val Thr Ala Lys

30 35 40

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

18/25

act gcc ttt cta ttt att tta cct cag tat aac att agc gtg cct aca			255
Thr Ala Phe Leu Phe Ile Leu Pro Gln Tyr Asn Ile Ser Val Pro Thr			
45	50	55	60
gca gac agt gag acc gtg cac tac cac tat ggc cct aag gac ctg gtc			303
5 Ala Asp Ser Glu Thr Val His Tyr His Tyr Gly Pro Lys Asp Leu Val			
65	70	75	
aca atc ttg ttc tac atc ttc atc acc atc atc ttg cat gct gtg gtt			351
Thr Ile Leu Phe Tyr Ile Phe Ile Thr Ile Ile Leu His Ala Val Val			
80	85	90	
10 cag gag tac att tta gat aaa atc agc aaa cgg ctt cat ctc tcc aaa			399
Gln Glu Tyr Ile Leu Asp Lys Ile Ser Lys Arg Leu His Leu Ser Lys			
95	100	105	
gtc aaa cac agc aag ttc aat gaa tct gga cag ctg gtc gtc ttt cat			447
Val Lys His Ser Lys Phe Asn Glu Ser Gly Gln Leu Val Val Phe His			
15 110	115	120	
ttc acc tcg gtg att tgg tgc ttc tac gtg gtg gtg acg gaa gga tac			495
Phe Thr Ser Val Ile Trp Cys Phe Tyr Val Val Val Thr Glu Gly Tyr			
125	130	135	140
tta aca aac cca aga agc ctc tgg gaa gac tac ccg cat gtg cac ctc			543
20 Leu Thr Asn Pro Arg Ser Leu Trp Glu Asp Tyr Pro His Val His Leu			
145	150	155	
ccc ttc cag gtg aag ttt ttc tac cta tgc cag ctg gcc tac tgg ctg			591
Pro Phe Gln Val Lys Phe Phe Tyr Leu Cys Gln Leu Ala Tyr Trp Leu			
160	165	170	
25 cac gca ctt cct gag cta tac ttc cag aag gta cgg aag gag gaa att			639
His Ala Leu Pro Glu Leu Tyr Phe Gln Lys Val Arg Lys Glu Glu Ile			
175	180	185	
ccc cgc cag ctc cag tat att tgc ctg tac ctg gtg cat ata gct gga			687
Pro Arg Gln Leu Gln Tyr Ile Cys Leu Tyr Leu Val His Ile Ala Gly			

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

19/25

	190	195	200														
	gca tac ctc tta aac ctg agc cgc ctg ggc ctg atc ttg ctg ctg ctg			735													
	Ala	Tyr	Leu	Leu	Asn	Leu	Ser	Arg	Leu	Gly	Leu	Ile	Leu	Leu	Leu		
	205	210		215		220											
5	cag	tac	tca	act	gag	ttc	ctc	ttc	cac	acg	gct	aga	ctc	ttc	tac	ttt	783
	Gln	Tyr	Ser	Thr	Glu	Phe	Leu	Phe	His	Thr	Ala	Arg	Leu	Phe	Tyr	Phe	
	225			230		235											
	gca	gat	gaa	aac	aac	gag	aaa	ctg	ttc	agt	gcc	tgg	gct	gct	gtt	ttt	831
	Ala	Asp	Glu	Asn	Asn	Glu	Lys	Leu	Phe	Ser	Ala	Trp	Ala	Ala	Val	Phe	
10	240		245		250												
	ggg	gtt	acc	cgc	ctc	ttc	atc	ctc	acc	ctt	gcc	gtg	ctg	gcc	att	ggc	879
	Gly	Val	Thr	Arg	Leu	Phe	Ile	Leu	Thr	Leu	Ala	Val	Leu	Ala	Ile	Gly	
	255		260		265												
	ttt	gga	ctg	gct	cgc	atg	gaa	aac	cag	gca	ttt	gat	ccc	gag	aaa	ggg	927
15	Phe	Gly	Leu	Ala	Arg	Met	Glu	Asn	Gln	Ala	Phe	Asp	Pro	Glu	Lys	Gly	
	270		275		280												
	aac	ttc	aac	act	ttg	ttt	tgc	agg	ctc	tgc	gtg	ctg	ctg	gtg	tgt		975
	Asn	Phe	Asn	Thr	Leu	Phe	Cys	Arg	Leu	Cys	Val	Leu	Leu	Val	Cys		
	285		290		295		300										
20	gcc	gcc	cag	gcc	tgg	ctc	atg	tgg	cgc	ttc	atc	cac	tcc	cag	ctg	cgg	1023
	Ala	Ala	Gln	Ala	Trp	Leu	Met	Trp	Arg	Phe	Ile	His	Ser	Gln	Leu	Arg	
	305		310		315												
	cac	tgg	cgg	gaa	tac	tgg	aat	gag	cag	agt	gca	aag	cgg	aga	gtc	cca	1071
	His	Trp	Arg	Glu	Tyr	Trp	Asn	Glu	Gln	Ser	Ala	Lys	Arg	Arg	Val	Pro	
25	320		325		330												
	gcc	aca	ccc	aga	cta	cca	gcc	agg	ctc	atc	aag	agg	gaa	tct	ggt	tac	1119
	Ala	Thr	Pro	Arg	Leu	Pro	Ala	Arg	Leu	Ile	Lys	Arg	Glu	Ser	Gly	Tyr	
	335		340		345												
	cat	gaa	aat	gga	gtg	gtg	aag	gca	gag	aac	gga	acc	tcc	cca	cgg	act	1167

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

His Glu Asn Gly Val Val Lys Ala Glu Asn Gly Thr Ser Pro Arg Thr

350 355 360

aag aaa ctc aag tct ccc taaggccaaa gtgctaagaa caggaatcct 1215

Lys Lys Leu Lys Ser Pro

5 365 370

cttgggtgggg gccgagcagg gggcaaggag cccaggcccc ctccctgcct cctccttcct 1275

gcctgtgatg ctccgtctca aacagccgaa acctgtcttgc caatgggggg agggggcggtt 1335

tgcctttcct ttttcttggc ttccctttat tttccaccaa accattctca ataaagccaa 1395

aaatctttctt ctttctcccc ctcaggccac ctccgtcct cactcctgtc ctgtgctggc 1455

10 ttttctggaa cgccaggcgc ccatggctgg cacctttctg ctgtctgtt ttcttgccct 1515

atggctgctg cttttcctt ttacttccta tttcacctt atcttgcata ttcttgtct 1575

gattttaca atgggggggg agctaagatt gcagtccgtt cttcgggtcc cccagggcct 1635

gccggtcaga agcctggggc tggttaggccc ttgggtggtcc tcatagtggat gggcaagaag 1695

agagcggcca tctcggatca taatctcctt ggtgctgtt aactgacgag atatatgatt 1755

15 ccagttctgc atgtaccatc ttgaggcaca gcagccactg ctctgtttaa atgccaaggc 1815

atttggcttt gggacgtgac aactcaatcc agaaggatgg tgtgaactcg gttgggtccc 1875

gtgactcgag ctccctaccag tggctggccg cggattggaa gccagcctgc tgcgtctg 1935

tggggaggac atgtcttccc actgcttaga gcgagagcag agcaaactgc gcagcaggca 1995

cctccagaaa ggtaatggtg gcagaaccca cagtggagtc gacccaggcc tttctccagc 2055

20 agtcccagtc gccattgctt ttccagccat tcacaaggcat tcaaaaccaa accaaacagc 2115

agttcatata cctgcctgag ataggctggt cctcaccccttcc agagccagcc agccccgtca 2175

ggggccaaac ttactacctt gacttcatct ctagctgcag aaacactaag tctcaaggc 2235

ttcagccccca tgctggccc ttgggtttca gggagggtca cttggaccgc tggcatctg 2295

gccgccttg ttgagtgttc tttggatttgc tggttttttgc agcacaacta cagcatttt 2455

25 gactgcataa aaccatgact gactgagagt cactctctgg gtagatgata ggccgccttc 2415

tggccccccttc cctcacagat tctttccctt cccctccacc tgaagagaag gcctccaagt 2475

cctttgggtg ccttgcaggacttttagaa ggggcgttca gcttaaaaaa gccggtccta 2535

attacggccg gacgcagtag cttacgcctg ttatcccagc actttgggag gtcgagggtgg 2595

gcagatcacc tgaggttagg agttcaagac cagcctggcc aacatggta aaccccatct 2655

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

	ctactaaaaa tacaaaaaaat taggtgtagt ggcaggcacc tgtaatccca gctactcggtt	2715
	aggctgagggc aggagaatcg cttgaaccta gaaggtggag gttgcagtga gcggagattg	2775
	taccatggca ctccagcctg gacaacaaga gcgaaattct gtctaaaaaa acaaaaagtcc	2835
5	caattaagaa cctccgaact ctgttttag gcaaagggggaa gtagttcttg gtaggtgcag	2895
	gaatagtagt gtcatttggaa atactggtca tctttctgac atcacagtag aaacccaaacc	2955
	ttggatttag attcaaaaagg ggggaaatgg gtctttcat caaggcaact ccccttctcc	3015
	aagtcaactt catcatagat aaatttttagc ttcccagtaa ctgagggatt tgtttcctaa	3075
	cgcatttggaa ggccttcate cctctctacg ataaggttgc agaaatgggaa agagctaccc	3135
	gtggttgctt ttgattaccc ttaggaagtg agacagtgtt tttgaaaata tgtattctc	3195
10	ccatttctcc ctctccttcc ctgacacttc tctgggctgc acagcagaaa cgttggtaaa	3255
	agggcagttt ggtttcaaca cagcagacct gatatgggat cccttagcca cttagtcaa	3315
	acagccctga cagagtctat aattgagttc aggccccca cttgcctaa taactgcaaa	3375
	tcgcatttttc agccagcagc ctcctaagcc caccccttc ccccattaga gaacacccat	3435
	ccttagtgct ctccaggctg tgtcattggc agggcttcac atgcaggagg cctctctcag	3495
15	gtgagttccag gttaaaactgt tgagttgtgg cttcaacaga tatgtatggc atgctgggat	3555
	gtgccagggtg cctgcgttgt gccagttgct ggagaggttag tgtgagcaga gcagctgaaa	3615
	tcttgcacatc aagcaaccct catttcatg cctgttaggtt tccattgctc tgtcccagga	3675
	cacttgcgtg ccagagacgc cacaacttca tgtccctgtc tcttgcagc tccccgtgct	3735
	gccagttactt catgccttgg atgtggtccc accagccag tggctgggtt cagcttaggc	3795
20	tctgcttccc agtggacggg tgtgctaagg gtttattttt tgtaaaaaaaa aaaaaaaaaaac	3855
	aaaaaaaaaac cctgagacca tgagttgggc tggcatcttgc ccagcctggg cttagggat	3915
	gtttgggggg ggtggttaga gggtagttgt agggtacttt gtcacccccc tccccctgcc	3975
	accctccctg gcacgtttat ttcacagcag agccaagtct gtggcaggtt gacacagact	4035
	gtgttgcag agctgaaata attccacttc atcctatgag cgtgttggc tagcttggc	4095
25	taatttggc cactttggct gtttcttca gtttatgca ttctctcctg ccccaaagtgtt	4155
	ccaagccatt tgtgaaggct ctgccagaca cctccaagct tgagagctca gcaccatgca	4215
	ccaagagcag gaaaaagac gtaaacctac cccagcaact gtggccttc gacagccctg	4275
	gctaactaac ttacatttg gggaaagcca acagacacag caggaggaga gggaggtggc	4335
	gctgggtggac caaggatctg tgctaccgc tccctccctt ggaggtgcag tgatgatggg	4395

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

	agttattttt accatccggg cgctgatagc tgcactatta ataaattgca tgtgttcctt	4455
	ttgaaggtag gggatggttc tgggtgagag gggagcaggc tgagccggcg ggggatctgc	4515
	tgtcctccct tttgagtcag tttaatccc atgtgtgtct gggccaccag accgaaatgg	4575
	ttgctgagaa acttgtctgt tcatagtccca aggataact tcccaacatt taagaaaccc	4635
5	caatagacac ctctgccctg gccacgttca cagatccttc tcttgaccgg aaaccctggg	4695
	accctaagaa cccctgaagc ttggggtggg tgtgtgcttc tggggtctct tttgggacct	4755
	cctttgtcag taccccttct ttttctaag cagctaataa gaggttgggt gaaagagtgc	4815
	atctccccc aggattccac aacaaaattc ttatcttcca tggatgcttt aattggaagt	4875
	gggttgcga cccccttgtg cctagaaaag gccttgctt gggttcctt tgtatgcttc	4935
10	agccttccta gtgggtttt ctaggcctgg tgtgagaggt agggaaagtct gcacataact	4995
	aattctttt ctaagggcc tatggcacaa gtgcacaaac ttcaattctt gatgttctaa	5055
	gctcttcctt ctaacagagg gagtgctgaa agctttgag tcaagacaat ggagtgcct	5115
	tcctccctca ctctgccttc cgagcttatg gttcctttc tcaggagagg attttcagga	5175
	ttattggagg attaggtcat tgtcagatga ctggaaaacc taaataggat ctcttcag	5235
15	ctcaaggttg tcccagttag gaagacttta ccaacttctc actctacccc actactcaca	5295
	tgagtgttag ctccaccttg caaaggctga agaccagttc tccccagtga aagctgcctc	5355
	attctttat ggagttccct ggagtggcag agctataaag acgagcattg ggatttgcag	5415
	tctccatgta gccttcgtg cttggcaacc cctgtagact tttgtccca agcagattgc	5475
	gtgcgtgcgc ctgtgtgtga gaataagtgc cttacttgc tgtgtggtt tcaacttgta	5535
20	ctccgtggcc agcccccaagt tgccagggtc cgacggcagc caaggacacc atacctcagt	5595
	atagttatat ataaaatgga cacggattgt gacagttca ccccatttgc ttctaaacccc	5655
	gctgcccagg attagggtct gtgggtgttt ctgtttgtt tttggttct cccttgtc	5715
	agttcttc tggcccagct gggtggctgt ggaagtctgt gaggtggccc aaccacaagc	5775
	atacctatta agagaagccc agagcttcca gccccactt cgaaaactct cctctggccc	5835
25	cacatagcaa actccttctc cgttattttc cccacccca gatTTTTT aaaaggccc	5895
	cttgcataa cctctttgg tctatttgc ttcccattca gcccaaagtt tatatgataa	5955
	aggtgtttac ttttacttcc cagtctccaa gtgctaacac ataaacacat acatgtctga	6015
	ctgttgcaga actgttcgag ctccataattc agtgttacct tgttttagtc gcagcaaccc	6075
	tctccctac cccttgcccg cccacgtttt tctcacttcc cggggtgtg caataactct	6135

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

23/25

	ccccagccagt ggtcctttcc acagccttcc tgtcccttaa aacacctgca actggggag	6195
	aaatgggacc catgggaggg ggagtcatca tcccttacac aagaaaatgc cactttcctt	6255
	ttgttgtcat tcttgtgatc ctgggtgggt ttctgtggca ctctttaga acatgttagca	6315
	tcatctttaga ggtctatttt taaaaaatgt gttgaagagg aaaaaaccat tctcacgatg	6375
5	gggcttaagt cattgtccag gaataagatt ggcgtggtgc ccatgacatc accgtcactc	6435
	tgcctaaaag cactcttagag ctacttgttc acgtggagag gaaggatatt ttgcgaagca	6495
	acagccgcag gtggagagcc ctgttcaccc gatagggtct agctgtgaca gtaaatataa	6555
	taccgctgtt tccttggta cagatttgag tttcatgtg atgagactgt aaacctcatt	6615
	tttcggttcc tctgttaaa aaaacatctg aaggatgaac taaggctgct ggtgccctga	6675
10	gcaactgata atgcaaatgt ggacaaagtg tctgtttct actctagcct gttcatatgg	6735
	accaaatttc aacaaggaac tcaagggaaa tttgtacctg ccgtatttat gcttcatgt	6795
	aaaaaagggt tggggggagg ggtgtcttt tgctttgggt gaacttttt tcaaaatcat	6855
	tttccactg tttctgtctg gtttaaaac aaattacagt tttgtatgga ttttttaaat	6915
	gtacattttgg aacaaatga tcaaataattt tctgaaataa caataaaagg cagaaaattt	6974

15

&lt;210&gt; 13

&lt;211&gt; 370

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

20

&lt;400&gt; 13

Met Ala Phe Arg Arg Arg Thr Lys Ser Tyr Pro Leu Phe Ser Gln Glu

5

10

15

Phe Val Ile His Asn His Ala Asp Ile Gly Phe Cys Leu Val Leu Cys

20

25

30

25

Val Leu Ile Gly Leu Met Phe Glu Val Thr Ala Lys Thr Ala Phe Leu

35

40

45

Phe Ile Leu Pro Gln Tyr Asn Ile Ser Val Pro Thr Ala Asp Ser Glu

50

55

60

Thr Val His Tyr His Tyr Gly Pro Lys Asp Leu Val Thr Ile Leu Phe

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

24/25

	65	70	75	80
	Tyr Ile Phe Ile Thr Ile Ile Leu His Ala Val Val Gln Glu Tyr Ile			
	85	90	95	
	Leu Asp Lys Ile Ser Lys Arg Leu His Leu Ser Lys Val Lys His Ser			
5	100	105	110	
	Lys Phe Asn Glu Ser Gly Gln Leu Val Val Phe His Phe Thr Ser Val			
	115	120	125	
	Ile Trp Cys Phe Tyr Val Val Val Thr Glu Gly Tyr Leu Thr Asn Pro			
	130	135	140	
10	Arg Ser Leu Trp Glu Asp Tyr Pro His Val His Leu Pro Phe Gln Val			
	145	150	155	160
	Lys Phe Phe Tyr Leu Cys Gln Leu Ala Tyr Trp Leu His Ala Leu Pro			
	165	170	175	
	Glu Leu Tyr Phe Gln Lys Val Arg Lys Glu Glu Ile Pro Arg Gln Leu			
15	180	185	190	
	Gln Tyr Ile Cys Leu Tyr Leu Val His Ile Ala Gly Ala Tyr Leu Leu			
	195	200	205	
	Asn Leu Ser Arg Leu Gly Leu Ile Leu Leu Leu Gln Tyr Ser Thr			
	210	215	220	
20	Glu Phe Leu Phe His Thr Ala Arg Leu Phe Tyr Phe Ala Asp Glu Asn			
	225	230	235	240
	Asn Glu Lys Leu Phe Ser Ala Trp Ala Ala Val Phe Gly Val Thr Arg			
	245	250	255	
	Leu Phe Ile Leu Thr Leu Ala Val Leu Ala Ile Gly Phe Gly Leu Ala			
25	260	265	270	
	Arg Met Glu Asn Gln Ala Phe Asp Pro Glu Lys Gly Asn Phe Asn Thr			
	275	280	285	
	Leu Phe Cys Arg Leu Cys Val Leu Leu Val Cys Ala Ala Gln Ala			
	290	295	300	

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

25/25

Trp Leu Met Trp Arg Phe Ile His Ser Gln Leu Arg His Trp Arg Glu  
305 310 315 320

Tyr Trp Asn Glu Gln Ser Ala Lys Arg Arg Val Pro Ala Thr Pro Arg  
325 330 335

5 Leu Pro Ala Arg Leu Ile Lys Arg Glu Ser Gly Tyr His Glu Asn Gly  
340 345 350

Val Val Lys Ala Glu Asn Gly Thr Ser Pro Arg Thr Lys Lys Leu Lys  
355 360 365

Ser Pro  
10 370

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/05631

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N5/10, G01N33/53, C12Q1/68,  
 C07K16/18//C12P21/02, C12P21/08, A61K38/16, A61K48/00,  
 A61P35/00, A61P25/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/12, C07K14/47, C12N5/10, G01N33/53, C12Q1/68,  
 C07K16/18, C12P21/02, C12P21/08, A61K38/16, A61K48/00,  
 A61P35/00, A61P25/28

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genebank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
 WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Nobuo Nomura et al. "Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes.II. The Coding Sequences of 40 New Genes (KIAA0041-KIAA0080)Deduced by Analysis of cDNA Clones from Human Cell Line KG-1", DNA Res. (1994), Vol. 1, No. 5, pages 223-229	1-32
A	Dirk Gorlich et al. "A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation", Nature (1992), Vol. 357, No. 6373, pages 47-52	1-32

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E"	earlier document but published on or after the international filing date
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&"	document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
13 January, 2000 (13.01.00)Date of mailing of the international search report  
25 January, 2000 (25.01.00)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP99/05631

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. C1' C12N15/12, C07K14/47, C12N5/10, G01N33/53, C12Q1/68,  
 C07K16/18//C12P21/02, C12P21/08, A61K38/16, A61K48/00,  
 A61P35/00, A61P25/28

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. C1' C12N15/12, C07K14/47, C12N5/10, G01N33/53, C12Q1/68,  
 C07K16/18, C12P21/02, C12P21/08, A61K38/16, A61K48/00,  
 A61P35/00, A61P25/28

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

## 国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, Genebank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,  
 WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), REGISTRY(STN)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリーエ	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Nobuo Nomura et al. "Prediction of the Coding Sequences of Unidentified Human Genes. II. The Coding Sequences of 40 New Genes(KIAA0041-KIAA0080)Deduced by Analysis of cDNA Clones from Human Cell Line KG-1" DNA Res. (1994) Vol. 1, No. 5, p. 223-229	1-32
A	Dirk Gorlich et al. "A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation" Nature(1992) Vol. 357, No. 6373, p. 47-52	1-32

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリーエ

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)  
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
 「&」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

13.01.00

## 国際調査報告の発送日

25.01.00

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
 郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官(権限のある職員)

新見 浩一

4N 9637



電話番号 03-3581-1101 内線 3488

THIS PAGE BLANK (USPTO)